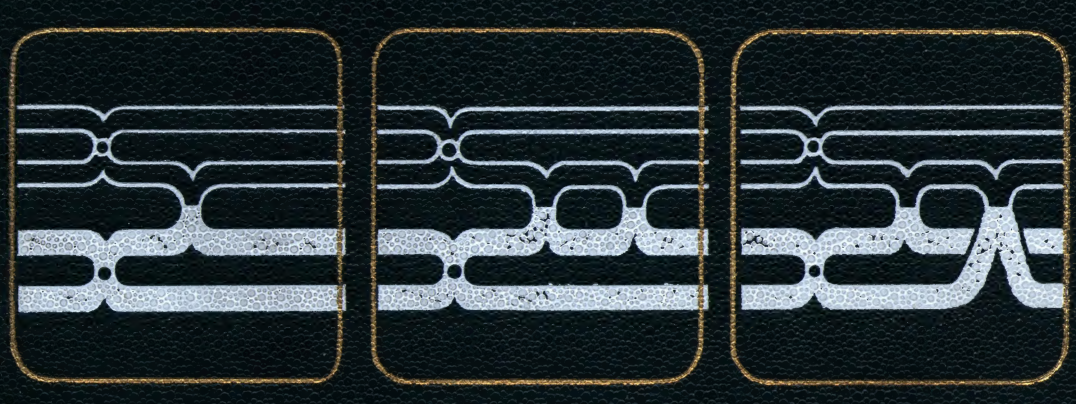
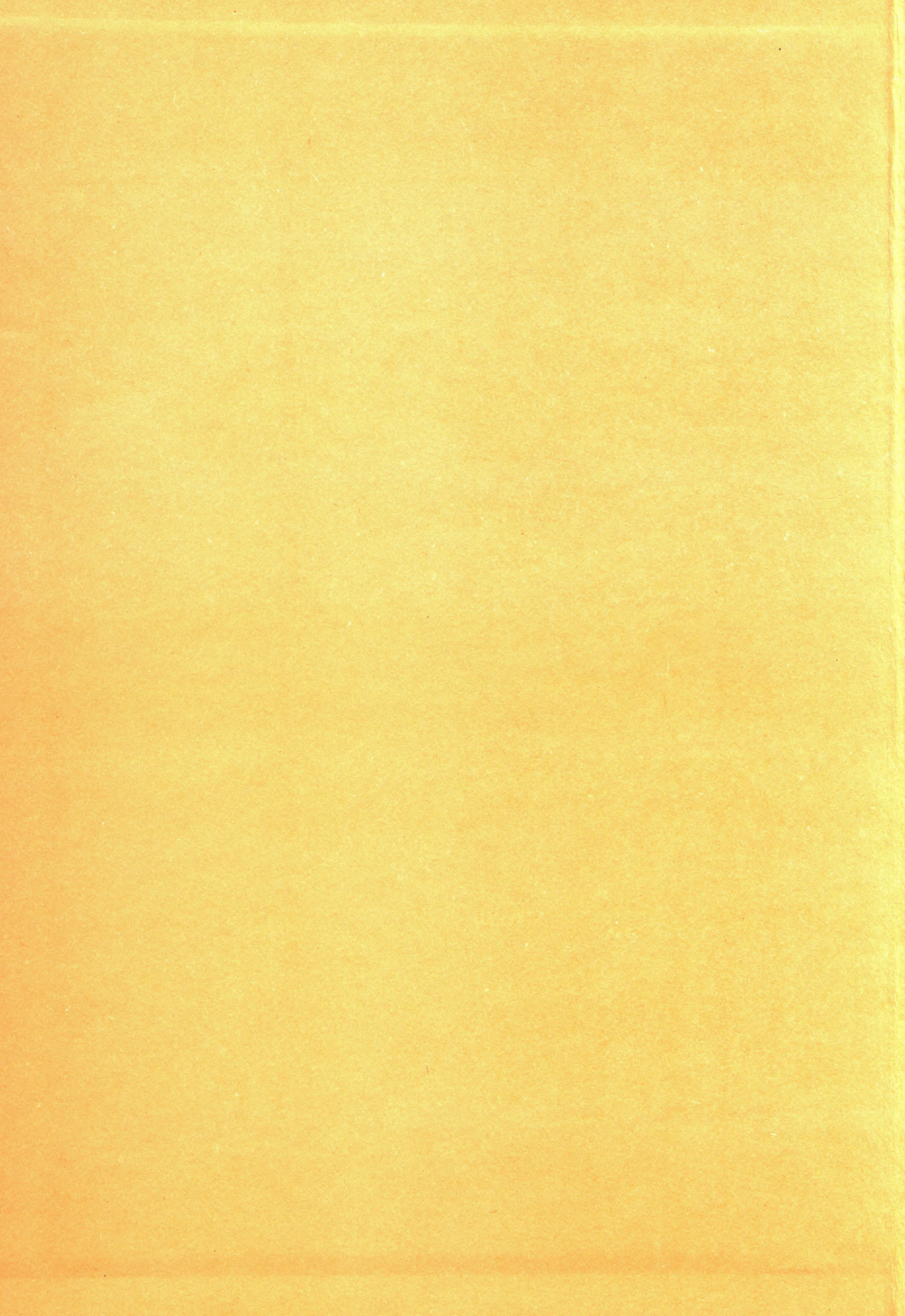
Ф. АЙАЛА, Дж. КАЙГЕР

1

Современная генетика



ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»







Современная генетика

MODERN GENETICS

Francisco J. Ayala
John A. Kiger, Jr.
University of California, Davis

SECOND EDITION

The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
Menlo Park, California Reading, Massachusetts
London Amsterdam Don Mills, Ontario Sydney

Ф. АЙАЛА, Дж. КАЙГЕР

Современная генетика

В трех томах

Том 1

Перевод с английского
канд. физ.-мат. наук А. Д. Базыкина

под редакцией
д-ра биол. наук Ю. П. Алтухова



МОСКВА «МИР» 1987

ББК 28.04
А37
УДК 575

Айала Ф., Кайгер Дж.

А37 Современная генетика: В 3-х т. Т. 1. Пер. с англ.:– М.: Мир, 1987.– 295 с., ил.

Учебное издание по генетике, написанное известными американскими учеными на уровне современных знаний. В первом томе описаны хромосомные основы наследственности, закономерности передачи наследственной информации, структура генома про- и эукариот, приводятся сведения о методах работы с ДНК.

Предназначена для генетиков, молекулярных биологов, эволюционистов, а также для студентов биологических и медицинских вузов.

А $\frac{2002010000–309}{041(01)–87}$ подписное **ББК 28.04**

Редакция литературы по биологии

Предисловие редактора перевода

Одна из характернейших черт современной науки – все углубляющаяся дифференциация и специализация знаний. Этот процесс достиг такого предела, за которым уже ощущается реальная угроза утраты взаимопонимания даже между представителями одной и той же научной дисциплины. Это в полной мере относится и к современной генетике. Представив ее в виде древа, уходящего корнями в известные закономерности, открытые в свое время Грегором Менделем и изложенные им на нескольких журнальных страницах, мы видим сегодня на этом древе десятки больших и малых ветвей, многие из которых выросли буквально на наших глазах и каждая из которых достойна монографического описания на своем собственном, неповторимом языке.

Между тем по самой своей сути и в силу лежащей в ее основе исторической традиции, наука должна быть единой, только в таком случае она способна адекватно отображать объективный мир и приносить максимальную практическую пользу. Именно это обстоятельство определяет возросшую как никогда ранее необходимость создания таких учебников и учебных пособий, в которых непомерно разросшийся и усложнившийся материал был бы упорядочен в стройную систему, доступную целостному восприятию. Понятно, сделать это нелегко, в связи с чем среди многих учебников по генетике, опубликованных за последние годы, почти нет удовлетворяющих требованиям времени. Редкое исключение – «Современная генетика» Ф. Айалы и Дж. Кайгера, предлагаемая вниманию читателей издательством «Мир». Эта книга уникальна. Будучи всеобъемлющей по охвату учебного материала, она вместе с тем отличается высокой органичностью и целостностью его изложения с учетом результатов новейших открытий и разработок. Язык книги ясен и лаконичен.

Поскольку «Предисловие» авторов достаточно полно раскрывает их замысел, а также структуру и особенности книги, какие-либо иные комментарии здесь излишни. Хочу лишь заметить, что успех «Современной генетики», опубликованной вторым изданием спустя всего четыре года после выхода первого, далеко не случаен. Авторы, как известно, преподают генетику в Калифорнийском университете (США), что дает им большое преимущество перед теми, кто пишет учебники, не имея опыта длительной работы и постоянного общения со студентами.

Кроме того, один из авторов книги хорошо известен в генетических кругах как ученый, внесший большой вклад в развитие популяционной и эволюционной генетики. Осмелюсь сделать следующее предположение: известное высказывание выдающегося генетика Ф. Г. Добржанского «...в биологии все обретает смысл лишь в свете эволюционного учения» в значительной мере реализовалось в структуре учебника и в способе подачи материала. Эволюционный и популяционный подходы, действительно позволяющие интегрировать знания о самых разнообразных генетических явлениях и процессах, представлены в «Современной генетике», как ни в каком другом аналогичном издании.

Мне думается, что публикация этой книги на русском языке встретит положительный отклик у студентов, преподавателей и научных работников, поскольку за последние 10–15 лет у нас не издавалось своих учебников такого уровня, как «Современная генетика». С чем это связано,– сказать непросто, однако, по-видимому, нельзя не признать: возрождение отечественной генетики, столь быстро набравшее силу в 60–70-е годы, в последнее десятилетие, к сожалению, сменилось определенным застоем. Однако так долго продолжаться не может. Генетика – подлинный фундамент биологии, и без ее гармоничного и быстрого развития мы не сможем решить те сложные и ответственные задачи, которые выдвигаются перед современной наукой самой жизнью. Наследственность человека и экология, философия, социология и психология, медицина, селекция и биотехнология,– вот далеко не полный перечень тех фундаментальных и прикладных направлений, успешная разработка которых возможна лишь во всеоружии современных генетических знаний.

В заключение хотелось бы сделать одно критическое замечание. Как увидит читатель, в списках литературы, рекомендуемой авторами в конце каждой главы, практически отсутствуют работы советских генетиков. Это весьма досадно, так как Ф. Айала является учеником Ф. Г. Добржанского, во многом способствовавшего укоренению в США традиций советской эволюционно-генетической школы, созданной С. С. Четвериковым.

В настоящем издании книга выходит в трех томах, соответствующих частям оригинальной книги.

Ю. П. Алтухов

Нашим учителям

Предисловие

Генетика – наука быстро развивающаяся. Этими словами начиналось предисловие к первому изданию «Современной генетики».

Справедливость этих слов, а также ценные замечания многих преподавателей, пользующихся первым изданием нашей книги, потребовали значительных дополнений и уточнений всего лишь через четыре года после ее появления.

«Современная генетика» может служить основным учебником при преподавании общей генетики. Предполагается, что студенты уже прослушали курсы общей биологии и химии. Тем не менее, некоторые важные темы (например, митоз и мейоз), с которыми студенты уже должны быть знакомы по этим курсам, излагаются в нашем учебнике заново. Мы умышленно включили в текст больше материала, чем можно пройти за один семестр. Книга написана таким образом, что позволяет преподавателям выбирать материал по своему усмотрению.

Молекулярные основы наследственности остаются основной темой современной генетики и в этом исправленном и дополненном издании. Бурное развитие метода рекомбинантных ДНК за последние четыре года открывает в понимании молекулярных основ генетики человека и других высших организмов такие широкие перспективы, о которых раньше можно было только догадываться. Характерной особенностью «Современной генетики» остается также углубленное изложение популяционной и эволюционной генетики.

Как и в первом издании, при написании книги мы основывались на «комплементарности» областей нашей компетенции. Ф. Айала написал полностью или в основном первый вариант глав 1–3, 10, 18, 19, 21–26 и приложение I; Дж. Кайгер написал начерно главы 4–9 и 11–17. Глава 20 писалась совместно. Последовательность наших фамилий на обложке мы определяли, бросая монету.

Структура книги

Организация материала в этом издании осталась той же, что и в первом, хотя некоторые вопросы изложены по-другому, и добавлены совершенно новые главы, посвященные методу рекомбинантных ДНК, регуляции действия генов эукариот и генетике соматических клеток. «Современная генетика» состоит из трех частей: часть первая – «Организация и передача генетического материала», часть вторая – «Экспрессия генетического материала» и часть третья – «Эволюция генетического материала». Мы уверены, что такая последовательность изложения одновременно и логична, и удобна для преподавания. Она способствует пониманию студентами того, почему излагаются те или иные вопросы и какое место они занимают в процессе наследования в целом. Однако при этом текст предоставляет преподавателю максимальную свободу при составлении конкретной программы курса. Даже если последовательность, в которой излагается материал отдельных глав существенно изменить, это не приведет к появлению серьезных пробелов в знаниях. Мы, однако, считаем, что каждая глава сама по себе составляет логически единое целое и внутри отдельных глав материал лучше всего преподавать в той последовательности, в какой он изложен в книге.

Некоторые изменения в организации и изложении материала по сравнению с первым изданием начинаются уже в первой части. Раздел о составлении хромосомных карт у эукариот (глава 5) был переписан и расширен в соответствии с замечаниями преподавателей и наших собственных студентов. Новая глава 6 посвящена комплементационному анализу и изучению тонкой структуры гена как у прокариот, так и у эукариот. Глава, в первом издании шедшая под номером девять, (Репликация, репарация и рекомбинация ДНК) превратилась в главы 13 и 14, перенесенные во вторую часть, поскольку акцент смещен на функционирование генов, обеспечивающих процессы репликации и рекомбинации ДНК. Новая глава 9 «Методы работы с ДНК» завершает первую часть, поскольку вопросы конструирования рекомбинантных ДНК и анализа последовательности нуклеотидов в ДНК, строго говоря, относятся к теме «Организация и передача генетического материала». Главы 6 и 7 были дополнены новыми появившимися в последние годы данными и получили в этом издании номера 7 и 8 соответственно. Значительная часть материала, входившего ранее в главу 8, в этом издании помещена в главы 6 и 14.

Во второй части появилась совершенно новая глава 16, посвященная регуляции экспрессии генов эукариот. Она в основном содержит результаты успешных исследований рекомбинантных ДНК. Материал главы, носившей этот номер, обновлен и составляет главу 17 «Генетический анализ процессов развития». Новая глава 18 «Генетика соматических клеток» включает впечатляющие результаты исследований по картированию генома человека. Главы 11 и 12 обновлены с тем, чтобы отразить наше углубившееся понимание эволюции генетического кода и потоков информации в клетках; о главах 13 и 14 уже говорилось выше.

В третьей части мы расширили в главе 21 раздел о дупликациях, поскольку расшифровка нуклеотидных последовательностей ДНК углубляет наше понимание роли дупликаций в эволюции, и добавили раздел об эволюции хромосом человека. В главе 22 при обсуждении

генной изменчивости описана изменчивость криптических белков и нуклеотидной гетерогенности. В главе 25 по-новому изложен вопрос о неравновесии по сцеплению в соответствии с новыми данными, полученными на основе исследования длинных последовательностей ДНК. В главу 26 включены новые разделы о реконструкции филогений на основе анализа последовательностей ДНК, об эволюции генома посредством удлинения, слияния и дупликации генов и об интригующей проблеме горизонтального переноса генов между видами.

Особенности книги

Это издание, как и предыдущее, щедро иллюстрировано с тем, чтобы облегчить усвоение материала.

Освещение различных специальных вопросов выделено в отдельные дополнения. Большую часть дополнений можно пропускать без нарушения понимания основного текста. Они могут служить источником выборочного факультативного материала.

В конце каждой главы приводится список ключевых слов и понятий для того, чтобы облегчить подведение итогов.

Задачи в конце каждой главы составляют неотъемлемую часть книги, некоторые из них содержат дополнительные сведения, которые мы сочли вспомогательными или слишком подробными для того, чтобы включать их в основной текст. В соответствии с пожеланиями многих преподавателей и студентов мы, наряду с трудными задачами, включили в каждую главу легкие. Ответы на задачи с нечетными номерами приведены в приложении 2 в конце книги.

Студенты, еще не слушавшие курса статистики, найдут в приложении 1 описание понятий и методов, необходимых для понимания текста и решения задач.

В завершающих каждую главу списках литературы перечисляются основные источники, содержащие излагаемый в тексте материал; кроме того, ссылки на дополнительную литературу даются в подписях к рисункам и к таблицам.

Больше всего мы обязаны всем тем ученым, чьи блестящие достижения сделали генетику столь увлекательной наукой. Многим из них мы особенно благодарны за щедрость, проявленную в предоставлении нам неопубликованных фотографий, в разрешении репродуцировать иллюстрации и т. д. Отзывы специалистов, прочитавших рукопись первого издания, внушают нам уверенность в том, что материал изложен достаточно полно и разносторонне. Новый материал, вошедший во второе издание, тоже тщательно рецензировался. За недостатки книги, конечно, несем ответственность только мы, однако многочисленные рецензии позволили свести число недостатков к минимуму.

Мы благодарны Кристал Димодика и Кенди Миллер, перепечатавшим рукопись, и Лоррейн Барр, которая помогла вычитать гранки. Ценную помощь в подготовке этого издания оказали также д-р Хелен К. Зальц, Бони Грегори и Элизабет Харпер. Лизелотт Горман квалифицированно отредактировала рукопись; мы признательны также издательскому редактору Фреду Раабу за его помощь в подготовке первого издания. На наш взгляд, книга очень выиграла благодаря искусству Джорджа Клатта, выполнившего большинство иллюстраций. Мы ис-

кренне благодарны сотрудникам издательства Бенджамин-Каммингс, в особенности Джиму Бенке, Джейн Гиллен и Пат Валдо за проделанную ими большую работу. Сотрудничество с издательством – это всегда стимулирующее занятие, в нашем случае оно было также и приятным.

Дэвис, Калифорния
январь 1984

Франциско Айала
Джон Кайгер-младший

Первое и второе издание рецензировали:

Joan W. Bennett, Tulane University
Sarane T. Bowen, San Francisco State University
Alice J. Burton, St. Olaf College
M. Campion, University of Keele, United Kingdom
D. J. Cove, University of Leeds, United Kingdom
Rowland H. Davis, University of California, Irvine
Linda K. Dixon, University of Colorado, Denver
Robert Dottin, Johns Hopkins University
James Farmer, Brigham Young University
Irving Finger, Haverford College
A. T. Ganesan, Stanford University
Lawrence T. Grossman, University of Michigan
Gary N. Gussin, University of Iowa
Barbara A. Hamkalo University of California, Irvine
Philip Hartman, Johns Hopkins University
Eugene R. Katz, S. U. N. Y., Stony Brook
Gary Ketner, Johns Hopkins University
Yun-Tzu Kiang, University of New Hampshire
George Lefevre, California State University, Northridge
Joyce B. Maxwell, California State University, Northridge
John R. Merriam, University of California, Los Angeles
Virginia Merriam, Loyola Marymount University
Roger Milkman, University of Iowa
Jeffrey B. Mitton, University of Colorado
William H. Petri, Boston College
Raymond L. Rodriguez, University of California, Davis
J. A. Roper, University of Sheffield, United Kingdom
Frank A. Ruddle, Yale University
Henry E. Schaffer, North Carolina State University
Steven R. Seavey, Lewis and Clark College
Eli C. Siegel, Tufts University
Franklin W. Stahl, University of Oregon
John Stubbs, San Francisco State University
J. R. Warr, University of York, United Kingdom

Организация и передача генетического материала

I

Введение

Знаменитый генетик Феодосий Добржанский утверждал, что «все в биологии обретает смысл лишь в свете эволюционного учения». Можно сказать еще более определенно: любой факт в биологии становится понятным лишь в свете генетики. Генетика – это сердцевина биологической науки; лишь в рамках генетики разнообразие жизненных форм и процессов может быть осмыслено как единое целое.

Основы генетики заложены открытиями, которые были сделаны Грегором Менделем в 1866 году, однако оставались почти неизвестными до 1900 года. В первой половине XX века исследователи пришли к выводу, что гены играют основную роль в функционировании и эволюции высших организмов. Однако в полной мере важность этого открытия стала ясна лишь после того, как было установлено, что веществом, ответственным за наследственность у всех организмов, являются нуклеиновые кислоты. Открытие химической структуры ДНК позволило понять молекулярные основы наследственности и механизмы действия генов и их передачи – в форме молекул ДНК из поколения в поколение. Наследственная информация хранится в форме нуклеотидной последовательности ДНК; реализация наследственной информации основана на том, что нуклеотидная последовательность ДНК определяет последовательность аминокислот в белках. Единство всего живого прекрасно демонстрируется тем фактом, что код, связывающий последовательность нуклеотидов в ядре с последовательностью аминокислот, одинаков для всех организмов, будь то бактерии, растения, животные или человек.

На протяжении последних десяти лет генетики разработали методы, которые позволили им в лабораторных условиях воссоздать последовательные этапы эволюции организмов. Более того, эти методы позволяют ставить эксперименты, в природных условиях невозможные. Используя метод рекомбинантных ДНК, генетики научились трансплантировать гены от одних организмов другим, т. е. переносить генетический материал способом, никогда не встречавшимся в эволюции жизни на Земле. Новое знание и возможности использовать его для достижения новых целей имеют глубокие последствия для всей биологии. К «жизни, какой мы ее знаем» в малой, но существенной степени, добавляется «жизнь, которую мы умеем делать».

Цель этой книги – представить генетику таким образом, чтобы, с одной стороны, читатель мог оценить ее место в биологии в целом, а с другой – представить себе путь, которым мы пришли к современному состоянию наших знаний. Вещество наследственности, ДНК, можно рассматривать в трех основных аспектах: структура, функционирование, эволюция. В соответствии с этим книга состоит из трех частей. В первой части описываются природа и организация наследственного материала, а также законы, подчиняясь которым информация, хранящаяся в этом материале, передается из поколения в поколение. Во второй части объясняется, как унаследованная организмом генетическая информация определяет его развитие и функционирование. В третьей части обсуждаются происхождение генетической изменчивости и генетические основы биологической эволюции.

Во введении мы напомним некоторые сведения, которые уже должны быть известны читателю из курса общей биологии. Во-первых, мы вкратце рассмотрим различные типы организмов, а во-вторых, расскажем о митозе и мейозе – двух процессах, посредством которых делятся клетки эукариот.

Вирусы

Мельчайшие частицы, которые могут считаться живыми,– это вирусы. Некоторые из них известны тем, что выступают в качестве возбудителей таких болезней, как грипп, полиомиелит и менингит. Вирусы были открыты в конце XIX века, когда удалось показать, что некоторые болезни (например, мозаичная болезнь табака) могут передаваться размножающимися частицами, столь мелкими, что они проходят сквозь поры фильтров, задерживающих бактерии. Вирусы являются облигатными паразитами животных, растений или микроорганизмов, т. е. они не могут размножаться самостоятельно. Попав в клетку хозяина, они перестраивают ее обмен таким образом, что клетка начинает синтезировать новые необходимые вирусу вещества. И хотя вирусы могут кристаллизоваться и не могут осуществлять собственный метаболизм, их все-таки причисляют к живым организмам, поскольку они способны к размножению.

Вирусы различаются по структуре, форме и размерам (см. рис. 1.1). В 1935 году Венделл Стенли (1904–1971) обнаружил, что в состав вирусов входят нуклеиновые кислоты и белки, т. е. те же соединения, из которых в основном состоят хромосомы высших организмов. Некоторые вирусы (главным образом растительные) содержат рибонуклеиновую

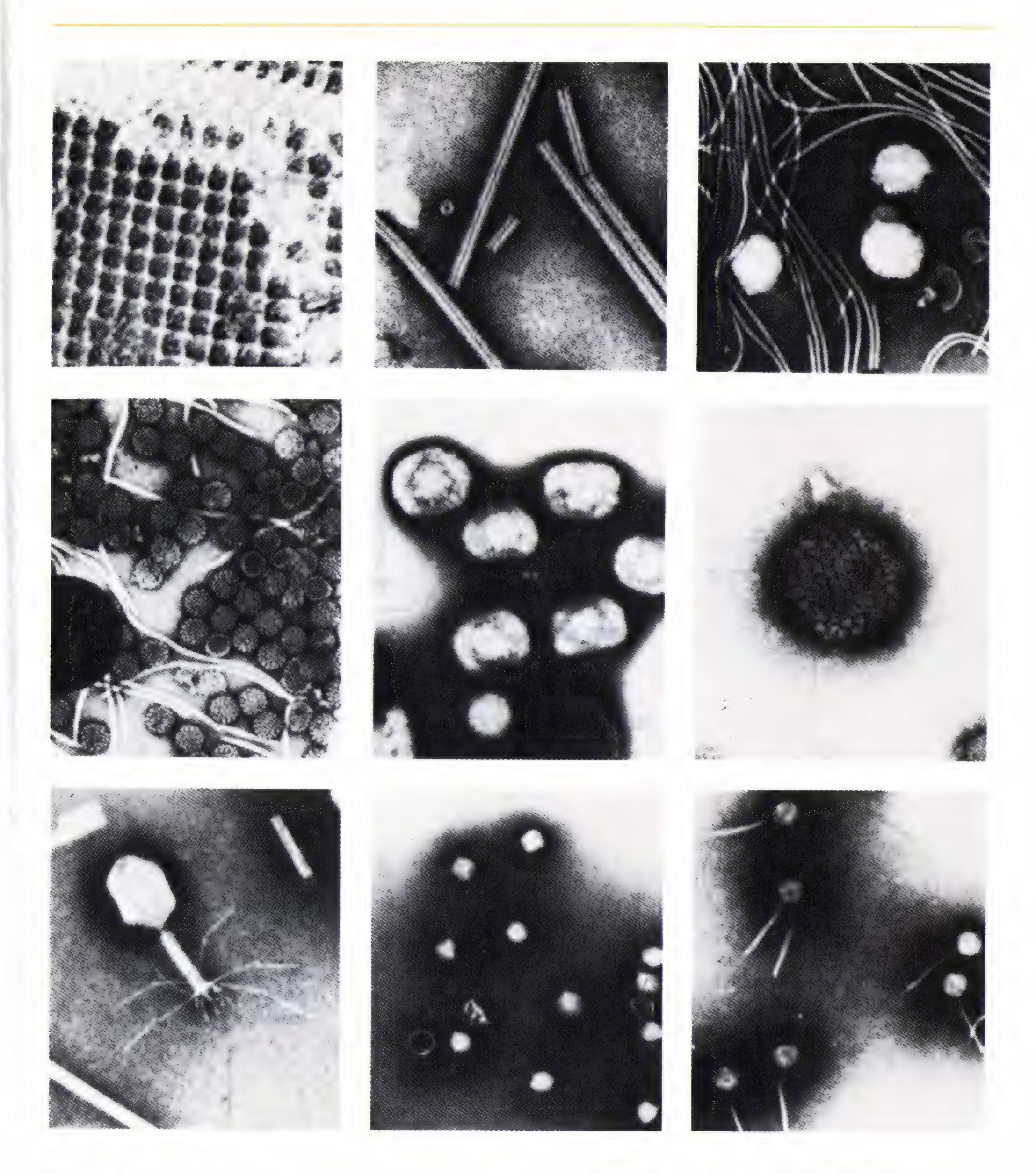


Рис. 1.1. Электронные микрофотографии различных вирусов. *Верхний ряд*: РНК-вирусы полиомиелита (увеличение × 115 000); табачной мозаики (× 145 000) и саркомы Рауса (× 55 000). *Средний ряд*: ДНК-вирусы папилломы кролика (× 65 000), оспы (× 40 000) и простого герпеса (× 140 000). *Нижний ряд*: ДНК-бактериофаги T4 (× 110 000), T7 (× 65 000) и лямбда (× 65 000) (Prof. *Robley C. Williams*, University of California, Berkely and Prof. *Harold W. Eisher*, University of Rhode Island)[1].

[1] Здесь и далее в круглых скобках указаны фамилии тех, кто любезно предоставил свои фотографии.– *Прим. ред.*

Рис. 1.2. Морфология нескольких бактериофагов. Видны различия в сложности строения. Многие бактериофаги активно используются в генетических исследованиях.

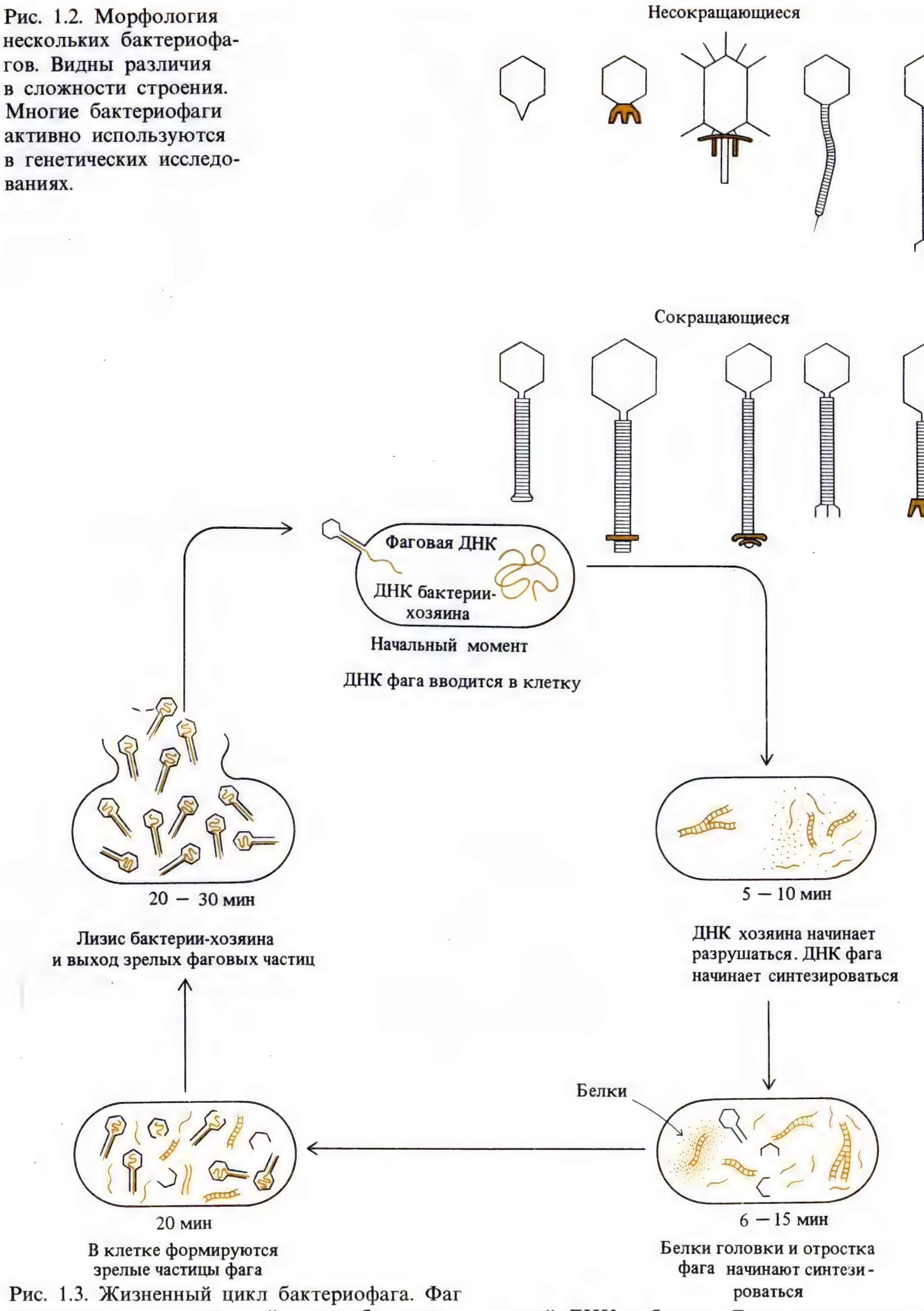


Рис. 1.3. Жизненный цикл бактериофага. Фаг прикрепляется к клеточной стенке бактерии и вводит в нее свою ДНК, которая перестраивает метаболизм клетки на синтез фаговой ДНК и белков. Далее происходит сборка новых фаговых частиц, которые высвобождаются при лизисе клетки.

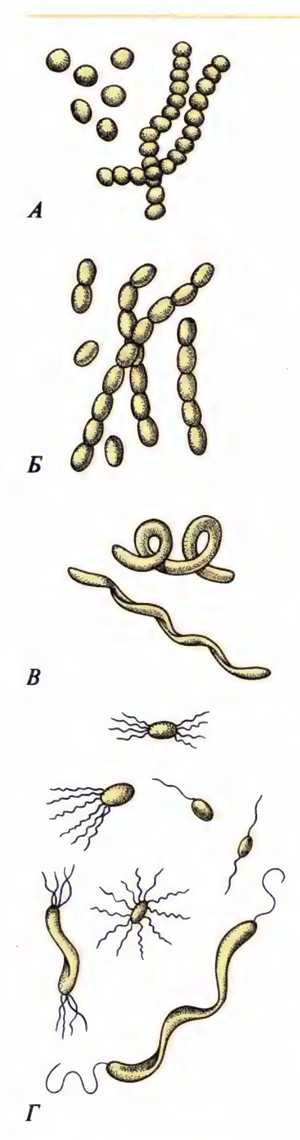


Рис. 1.4. Различные типы бактерий.
А. Кокки – сферические клетки, одиночные или образующие длинные цепочки. *Б*. Бациллы – клетки, имеющие форму палочек. *В*. Спириллы – клетки, имеющие форму спирали.
Г. У многих бактерий есть двигательные придатки, называемые жгутиками.

кислоту (РНК), остальные (в том числе многие вирусы животных и бактерий) – дезоксирибонуклеиновую кислоту. Вирусы могут иметь форму шара, палочки или состоять из «головы» и «хвоста». Вирусы, вызывающие ящур,– это шарики диаметром около 10 нм (1 нм = 10^{-6} мм). Вирус табачной мозаики имеет форму палочки диаметром около 15 нм и длиной 300 нм.

В генетических исследованиях чаще всего используются вирусы бактерий, известные также под названием *бактериофаги* (дословно «пожиратели бактерий») или просто фаги (рис. 1.2). Фаги прикрепляются к поверхности бактерии и вводят собственную ДНК внутрь клетки, заставляя ее синтезировать компоненты бактериофага. Из этих компонентов собирается множество новых бактериофагов, после чего клетка лизируется и новые фаговые частицы выходят наружу (рис. 1.3).

Прокариоты: бактерии и сине-зеленые водоросли

Простейшие клеточные организмы – это *прокариоты* (буквально «предъядерные»). К прокариотам относятся бактерии и сине-зеленые водоросли. Диаметр самых мелких бактерий составляет около 0,1 мкм (100 нм), т. е. они меньше наиболее крупных вирусов, однако крупные бактерии, имеющие форму палочки, достигают длины 60 мкм при поперечном диаметре 6 мкм. Бактерии могут иметь сферическую форму, форму палочек или спиралей (рис. 1.4). Клеточная мембрана бактерий окружена прочной клеточной стенкой. Их наследственное вещество заключено в единственной хромосоме, однако ядерной мембраны, отделяющей хромосому от остальной клетки, у бактерий нет (почему они и названы прокариотами). У бактерий нет также митохондрий и некоторых других органелл, характерных для цитоплазмы высших (эукариотических) клеток.

Некоторые бактерии, например *Escherichia coli*, обитающая в кишечнике человека и других млекопитающих, и *Pneumococcus pneumoniae* – возбудитель бактериальной пневмонии, активно используются в генетических исследованиях.

У сине-зеленых водорослей, так же как и у бактерий, есть клеточная стенка, однако ядерная мембрана и некоторые цитоплазматические органеллы отсутствуют. В отличие от бактерий сине-зеленые водоросли, как правило, образуют грозди или нити, состоящие из множества клеток.

Бактерии и сине-зеленые водоросли обычно размножаются простым делением клетки, которое происходит после дупликации (удвоения) хромосомы.

Одноклеточные и многоклеточные эукариоты

К *эукариотам* (буквально «обладающие настоящим ядром») относятся все клеточные организмы, кроме бактерий и сине-зеленых водорослей. В эукариотических клетках есть ядерная мембрана, ограничивающая *ядро*, в котором находятся по крайней мере две хромосомы. В хромосомах эукариот ДНК образует комплексы с определенными белками, которые называются *гистонами* (см. гл. 4). Кроме того, в эукариотических клетках присутствуют определенные органеллы и структуры, которых нет у прокариот: митохондрии, хлоропласты (только в клетках растений), аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум и вакуоли (рис. 1.5).

Эукариоты могут быть как одноклеточными, так и *многоклеточными*. Из одноклеточных эукариот наиболее часто в генетических экспериментах используются водоросль *Chlamidomonas reinhardi*, инфузория *Paramecium aurelia*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Из многоклеточных эукариот объектами генетических исследований часто бывают грибы *Neurospora crassa* и *Aspergillus nidulans*, кукуруза (*Zea mays*), плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*), домовая мышь (*Mus musculus*) и человек (*Homo sapiens*).

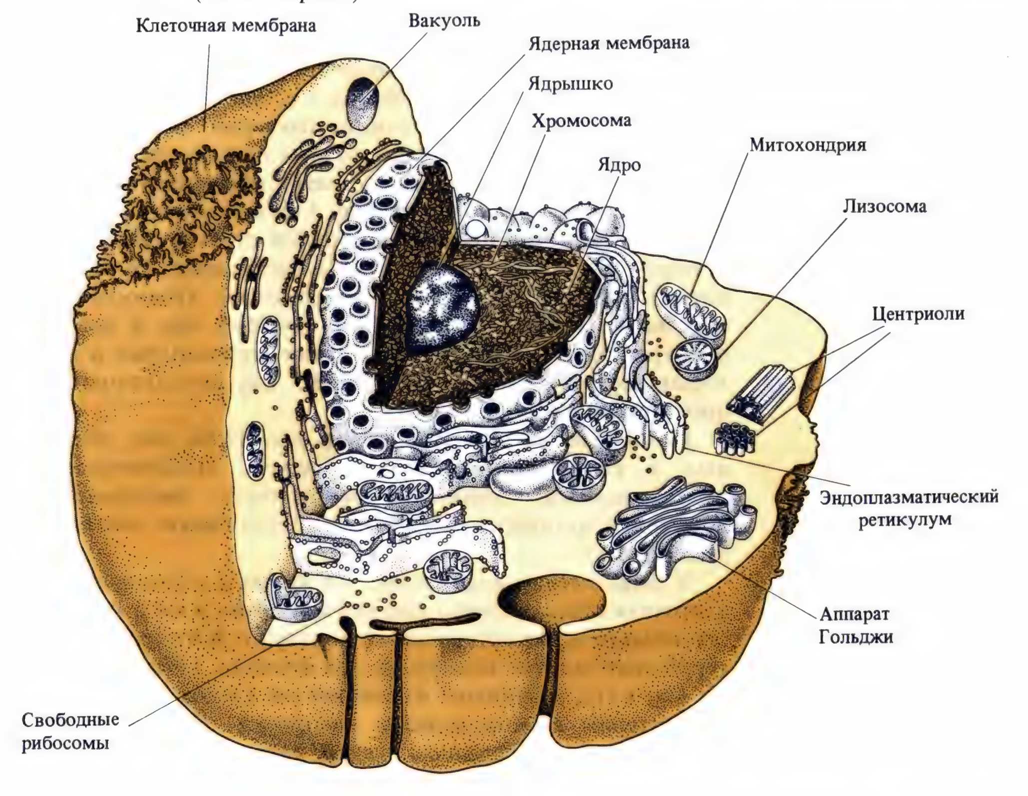


Рис. 1.5. Схема строения эукариотической клетки (на рисунке – клетки млекопитающего). Хорошо заметная органелла ядра – это ядрышко.

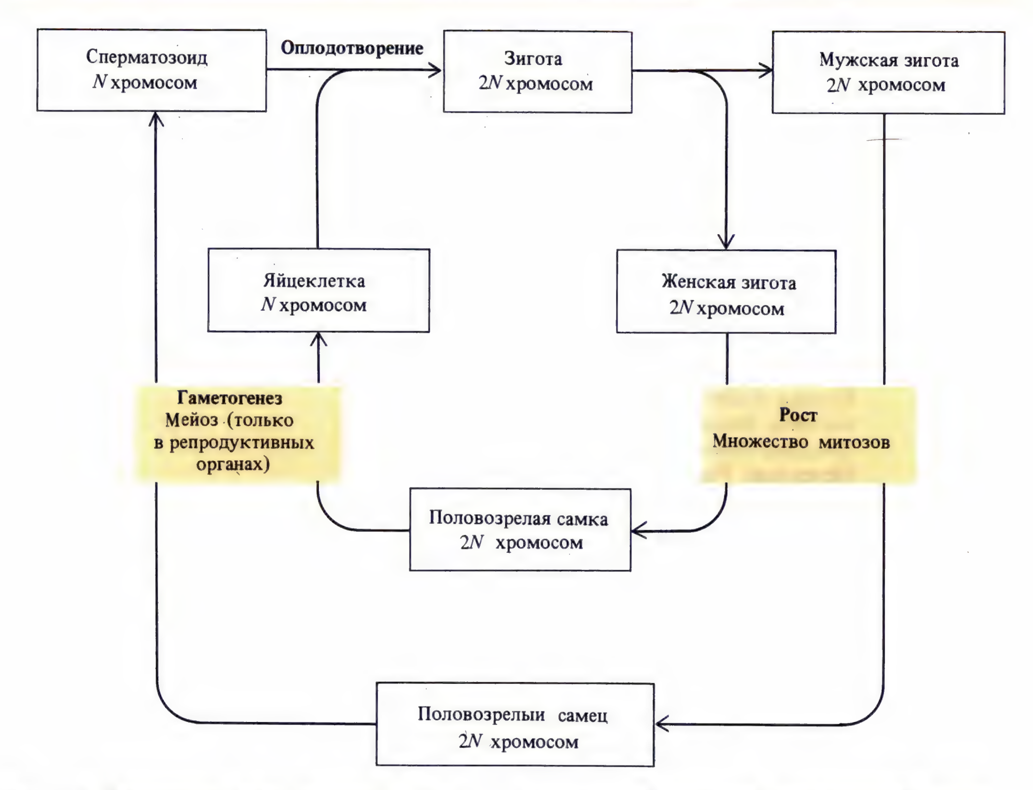


Рис. 1.6. Жизненный цикл организмов, размножающихся половым путем. В результате оплодотворения женской гаметы мужской гаметой образуется зигота. Зигота многократно последовательно митотически делится, давая начало множеству клеток организма. Те клетки, из которых формируются гаметы, называются клетками зародышевой линии. Они также размножаются митотически, но затем претерпевают мейоз, в результате которого число хромосом уменьшается вдвое. При половом размножении диплоидная и гаплоидная (гаметная) фазы обязательно чередуются.

Размножение у эукариот может быть *бесполым* (*вегетативным*) или *половым*. При бесполом размножении единственный родительский организм делится на две или несколько частей, причем из каждой вырастает по новой особи. Бесполое размножение широко распространено у растений: из маленького кусочка растения, отделенного надлежащим образом, при соответствующих условиях может образоваться новое растение. Картофель, например, легче разводить клубнями, чем семенами, а большинство фруктовых деревьев разводят черенками. Бесполое размножение встречается также у грибов и некоторых низших животных, например у плоских червей.

При половом размножении происходит слияние двух половых клеток или гамет; они образуют одну клетку, называемую *зиготой*, из которой развивается новый организм. Обычно гаметы принадлежат разным родителям. Исключением из этого правила является самооплодотворение, при котором обе гаметы производятся одним родительским организмом.

Жизненный цикл развития и полового размножения многоклеточных

Таблица 1.1. Диплоидное число хромосом ($2N$) различных видов животных и растений

Вид	Число хромосом
Человек *Homo sapiens*	46
Шимпанзе *Pan troglodytes*	48
Макак-резус *Macaca mulatta*	48
Лошадь *Equus caballus*	64
Осел *Equus asinus*	62
Собака *Canis familiaris*	78
Кошка *Felis domesticus*	38
Домовая мышь *Mus musculus*	40
Крыса *Rattus norvegicus*	42
Опоссум *Didelphys virginiana*	22
Курица *Gallus domesticus*	78
Индейка *Meleagris gallopavo*	82
Лягушка *Rana pipiens*	26
Меченосец *Platypoecilus maculatus*	48
Морская звезда *Asterias forbesi*	36
Тутовый шелкопряд *Bombyx mori*	56
Комнатная муха *Musca domestica*	12
Плодовая мушка *Drosophila melanogaster*	8
Комар *Culex pipiens*	6
Таракан *Blatta germanica*	23♂, 24♀
Рак-отшельник *Eupagurus ochotensis*	254
Белый дуб *Quercus alba*	24
Желтая сосна *Pinus ponderosa*	24
Слива *Prunus cerasus*	32
Капуста *Brassica oleracea*	18
Редька *Raphanus sativus*	18
Горох огородный *Pisum sativum*	14
Душистый горошек *Lathyrus odoratus*	14
Фасоль *Phaseolus vulgaris*	22
Огурец *Cucumis sativus*	14
Хлопчатник *Gossypium hirsutum*	52
Картофель *Solanum tuberosum*	48
Помидоры *Solanum lycopersicum*	24
Табак *Nicotiana tabacum*	48
Пшеница мягкая яровая *Triticum aestivum*	42
Пшеница английская *Triticum turgidum*	28
Ячмень *Hordeum vulgare*	14
Рожь *Secale cereale*	14
Рис *Oryza sativa*	24
Львиный зев *Antirrhinum majus*	16
Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*	34
Зеленая водоросль *Acetabularia mediterranea*	20

эукариот схематически изображен на рис. 1.6. Число хромосом в клетке, характерное для данного вида, сохраняется постоянным из поколения в поколение, поскольку существуют два типа деления клеток: один для образования соматических клеток (или клеток тела) и другой для образования гамет. Процесс деления соматических клеток называется *митозом*. При митозе все хромосомы дуплицируются (удваиваются) перед началом деления клетки. В процессе митоза дуплицированные хромосомы распределяются поровну между двумя дочерними клетками. В результате все соматические клетки организма обладают одинаковым



Рис. 1.7. 46 хромосом мужчины. В нижней части фотографии гомологичные хромосомы изображены попарно. Специально используемая методика окраски выявляет поперечную исчерченность, индивидуальную для каждой хромосомы. На этих хромосомах метафазной пластинки можно различить около 400 темных и светлых полос (Prof. *W. Roy Breg*, Yale University).

числом хромосом. Посредством митоза делятся также одноклеточные эукариоты.

Гаметы образуются в процессе *мейоза.* При мейозе каждая клетка делится дважды, а число хромосом удваивается лишь один раз. Вот почему число хромосом в гаметах вдвое меньше, чем в соматических клетках. Пара гамет (одна мужская половая клетка и одна женская) сливается в процессе, который называется *оплодотворением.* Образующаяся

при этом зигота имеет число хромосом, характерное для соматических клеток организма. Митоз и мейоз более подробно описаны в следующих разделах.

Если число хромосом в гамете обозначить буквой N, то число хромосом в зиготе будет равно $2N$, по половине от каждой из гамет. Если зигота делится митотически, то в каждой из двух дочерних клеток количество хромосом составит $2N$. В процессе развития эти клетки делятся снова и снова, и каждая из клеток многоклеточного организма содержит по $2N$ хромосом. Организм продуцирует также гаметы, но они возникают в результате мейоза, и каждая из них содержит лишь по N хромосом. Когда две гаметы при оплодотворении сливаются, восстанавливается число $2N$, характерное для данного вида организмов и сохраняющееся из поколения в поколение. Число хромосом в клетках различных эукариот может быть весьма различным. У некоторых видов хромосомное число равно двум; у других оно может достигать нескольких сотен (табл. 1.1). Клетки с двойным набором хромосом, т. е. соматические клетки, мы будем называть *диплоидными*; клетки с одинарным набором хромосом, т. е. гаметы, называются *гаплоидными*.

В диплоидных организмах две хромосомы одной пары называют *гомологичными*; хромосомы, не являющиеся членами одной пары, называются *негомологичными*. У раздельнополых организмов, к которым относится большинство животных, обычно одна из пар хромосом ответственна за определение пола; хромосомы этой пары называются *половыми*. Все остальные хромосомы носят название аутосом. Две половые хромосомы в отличие от всех других гомологичных хромосом не обязательно одинаковы по размеру и форме. Один из полов (у млекопитающих и многих насекомых это самцы, а у бабочек и птиц – самки) называется *гетерогаметным*, поскольку у представителей этого пола половые хромосомы (обычно обозначаемые буквами X и Y) резко отличаются друг от друга. Противоположный пол называется *гомогаметным*, особи этого пола обладают сходными половыми хромосомами (а именно Х-хромосомами). Таким образом, у людей, мышей и дрозофил самцы характеризуются парой половых хромосом XY, а самки – XX (рис. 1.7). У некоторых видов Y-хромосома вовсе отсутствует; гетерогаметный пол в таком случае обозначается символом XO, тогда как гомогаметный – по-прежнему символом XX.

Митоз

Митозом называется процесс деления ядра клетки, в результате которого из одной клетки образуются две дочерних, причем число хромосом в каждой из них совпадает с числом хромосом в родительской клетке. Хромосомы удваиваются в течение особого периода клеточного цикла, предшествующего митозу. Этот период называется S, по первой букве слова “synthesis”, поскольку в течение этого периода происходит синтез ДНК хромосом. S-периоду предшествует период G_1 (от слова “gap” – перерыв), а за ним следует период G_2. В течение периодов G_1 и G_2 рост клеток и метаболизм продолжаются, однако репликации хромосом не происходит. Если мы обозначим митоз буквой M, то последовательность событий на протяжении *клеточного цикла* может быть представлена в виде $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ (рис. 1.9). Затем цикл повторяется снова и снова, пока продолжается процесс деления клеток (пролиферация).

Дополнение 1.1. Хромосомы

Хромосомы представляют собой длинные нитевидные образования, которые во время деления клетки сжимаются, становясь короче и плотнее, так что в каждой можно различить *центромеру* и одно или два *плеча хромосомы*. В зависимости от расположения центромеры выделяются три типа хромосом (см. рис. 1.8);

1. *Метацентрические*, у которых плечи имеют примерно одинаковую длину (т.е. центромера расположена посреди хромосомы).

2. *Акроцентрические*, у которых длины плеч сильно различаются (т.е. центромера сдвинута к одному из концов хромосомы).

3. *Телоцентрические*, у которых хорошо заметно лишь одно плечо (т.е. центромера находится на самом конце хромосомы или очень близко от него).

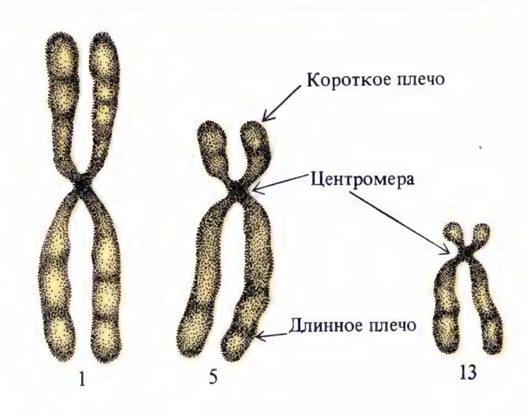


Рис. 1.8. Первая, пятая и тринадцатая хромосомы человека представляют на этом рисунке соответственно метацентрический, акроцентрический и телоцентрический типы хромосом.

Негомологичные хромосомы можно отличить друг от друга по размеру и положению центромеры. Некоторые участки хромосом называются *гетерохроматиновыми* («окрашенными по-другому»), поскольку они сохраняют плотную компактную структуру в интерфазе и на ранних стадиях профазы клеточного деления. Другие участки хромосом или целые хромосомы называются *эухроматиновыми* («нормально окрашенными»). Расположение гетерохроматиновых участков учитывают при идентификации хромосом.

Хотя митоз–это процесс, происходящий без резких переключений, однако определенные ключевые события позволяют выделить четыре стадии митоза: *профазу*, *метафазу*, *анафазу* и *телофазу* (рис. 1.10

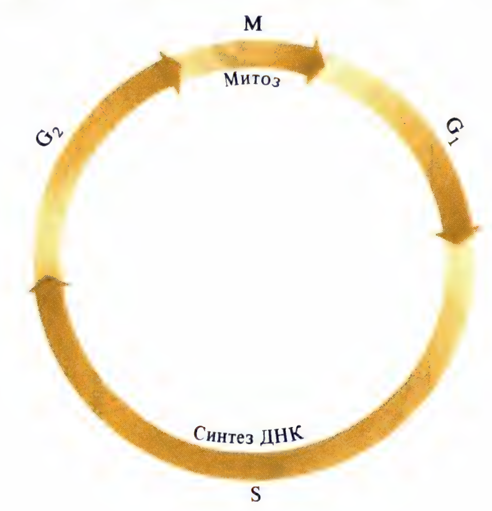


Рис. 1.9. Клеточный цикл. Период синтеза ДНК (S) отделен от предшествовавшего и последующего митозов (M) двумя «перерывами», G_1- и G_2-периодами соответственно. Относительная продолжительность S-, M- и G-периодов у различных организмов различна.

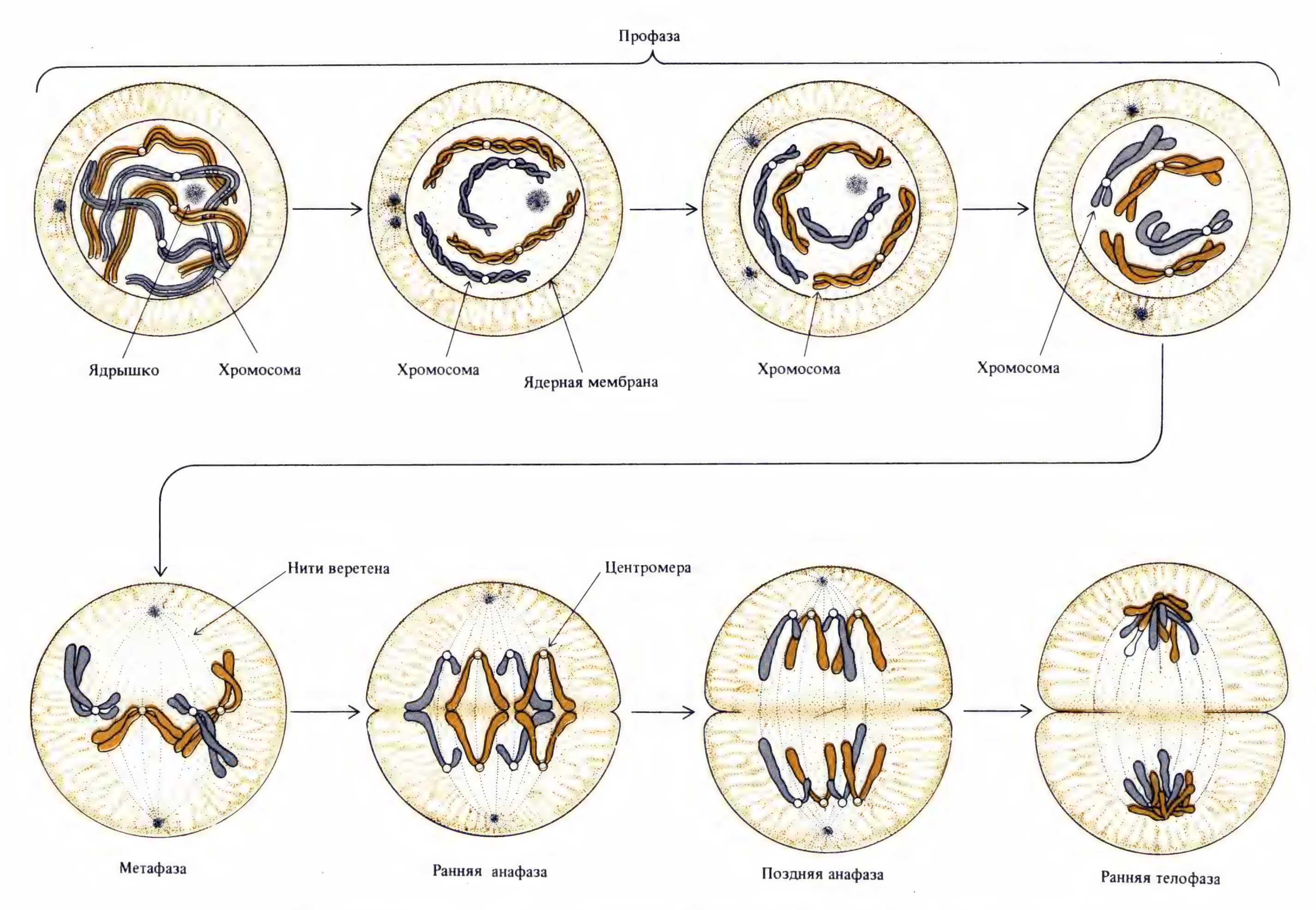


Рис. 1.10. Четыре стадии митоза. Дупликация хромосомного материала происходит в интерфазе, предшествующей началу профазы.

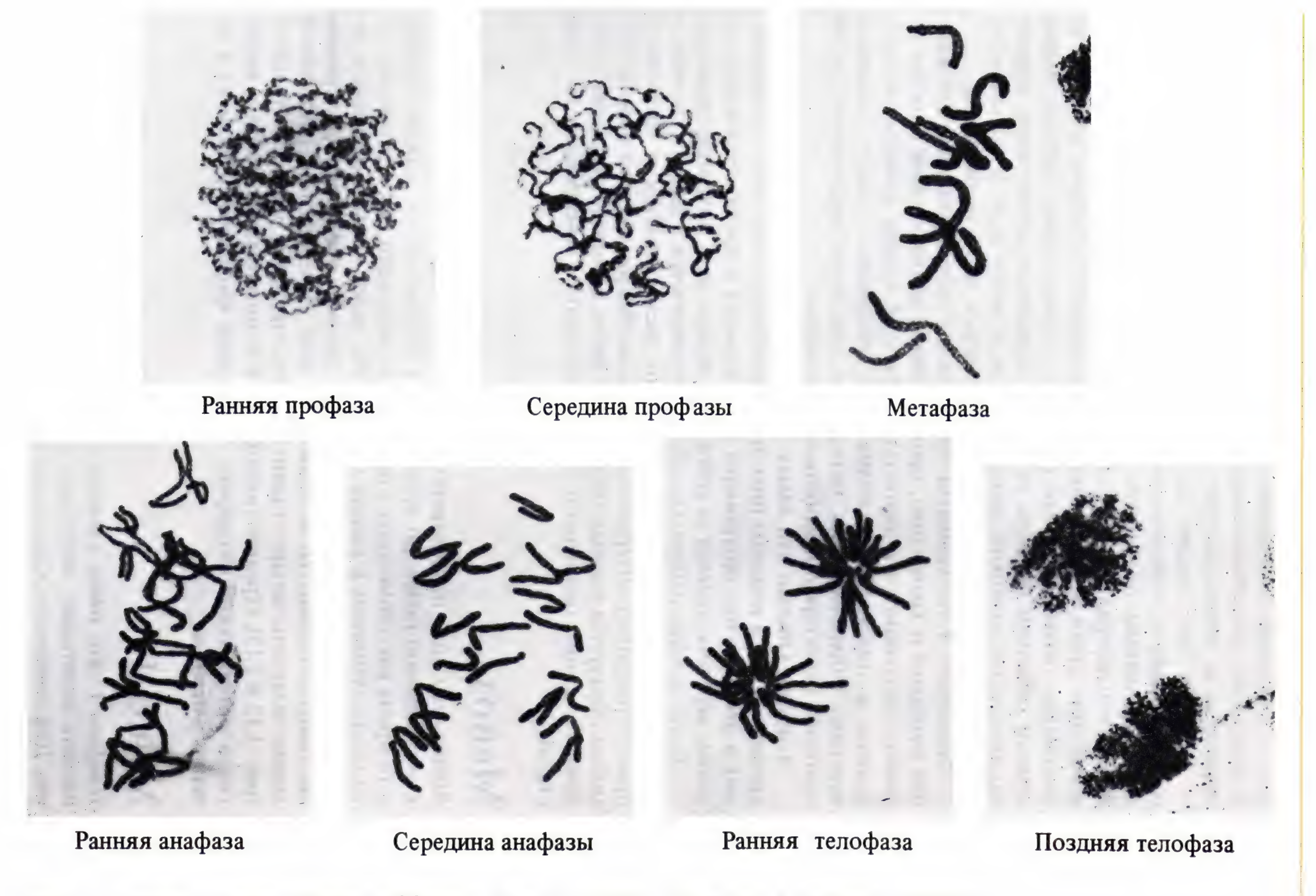


Рис. 1.11. Митоз у пиона, *Paeonia californica*, $2N = 10$ ($\times$ 850). (Dr. *Marta S. Walters*, University of California, Santa Barbara, and the late Prof. *Spencer W. Brown*, University of California, Berkely.)

и 1.11). О клетках, не участвующих в митозе, говорят, что они находятся в *интерфазе*; последовательные митозы всегда разделены интерфазным периодом, в течение которого происходит синтез ДНК.

Профаза. Эта стадия характеризуется постепенным уплотнением (конденсацией) и спирализацией хромосом, в результате чего они становятся различимы под микроскопом, образуя нитевидные структуры. Видно, что каждая хромосома состоит из двух копий, расположенных вдоль друг друга и соединенных центромерой. Эти копии, пока они не разошлись, называются сестринскими *хроматидами.* Другим характерным событием профазы является постепенное исчезновение ядрышка, содержимое которого распределяется по всему ядру. У большинства организмов в профазе начинает разрушаться ядерная мембрана.

Метафаза. У большинства организмов в этот период исчезает ядерная мембрана и хромосомы, прикрепленные центромерами к нитям *веретена*, оказываются в цитоплазме. На этой стадии хромосомы собираются в плоскости, расположенной посередине между полюсами веретена. Образовавшаяся метафазная пластинка представляет собой наиболее характерную особенность метафазы.

Анафаза. Обычно это самая короткая стадия митоза. Каждая центромера делится пополам (при этом хроматиды становятся хромосомами), и две дочерние центромеры устремляются к противоположным полюсам веретена, увлекая за собой по одной из двух дочерних хромосом.

Телофаза. Два набора хромосом группируются у противоположных полюсов веретена. Здесь они начинают раскручиваться и удлиняться, приобретая форму интерфазных хромосом. Вокруг каждого набора хромосом образуется ядерная мембрана, и вновь возникают ядрышки. Клеточное деление (*цитокинез*) также полностью завершается на этой стадии.

Мейоз

Мейоз – это два последовательных деления ядра, которые приводят к образованию гамет. Во время мейоза каждая клетка делится дважды, в то время как хромосомы удваиваются лишь один раз, в результате чего число хромосом в гамете оказывается вдвое меньше их числа в исходной клетке. Два последовательных деления обозначаются терминами *мейоз I* и *мейоз II*. В каждом из этих двух мейотических делений можно выделить четыре стадии: профаза, метафаза, анафаза и телофаза (рис. 1.12 и 1.13). Предшествующая мейозу интерфаза полностью аналогична митотической интерфазе; дупликация хромосом происходит в течение S-периода.

Мейоз I

Профаза I. Это очень сложная стадия, которую обычно подразделяют на пять подстадий: лептотену, зиготену, пахитену, диплотену и диакинез. Для *лептотены* характерно начало спирализации и уплотнения хромосом; они приобретают нитевидную форму и похожи на хромосомы в начале профазы митоза.

На стадии *зиготены* гомологичные хромосомы конъюгируют, т.е. соединяются друг с другом наподобие застежки «молния». Такое соединение гомологичных хромосом называется *синапсисом.* Это важное ге-

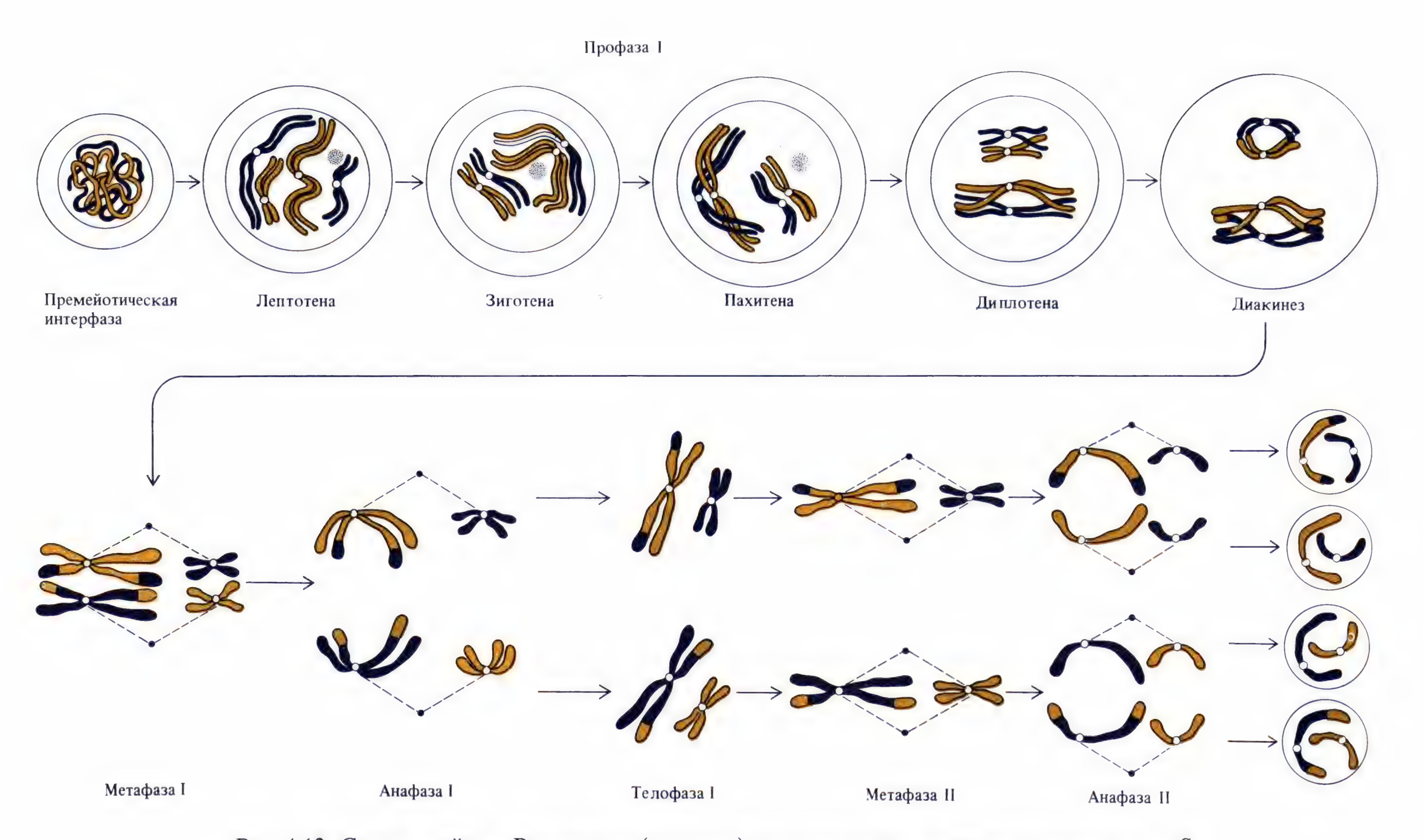
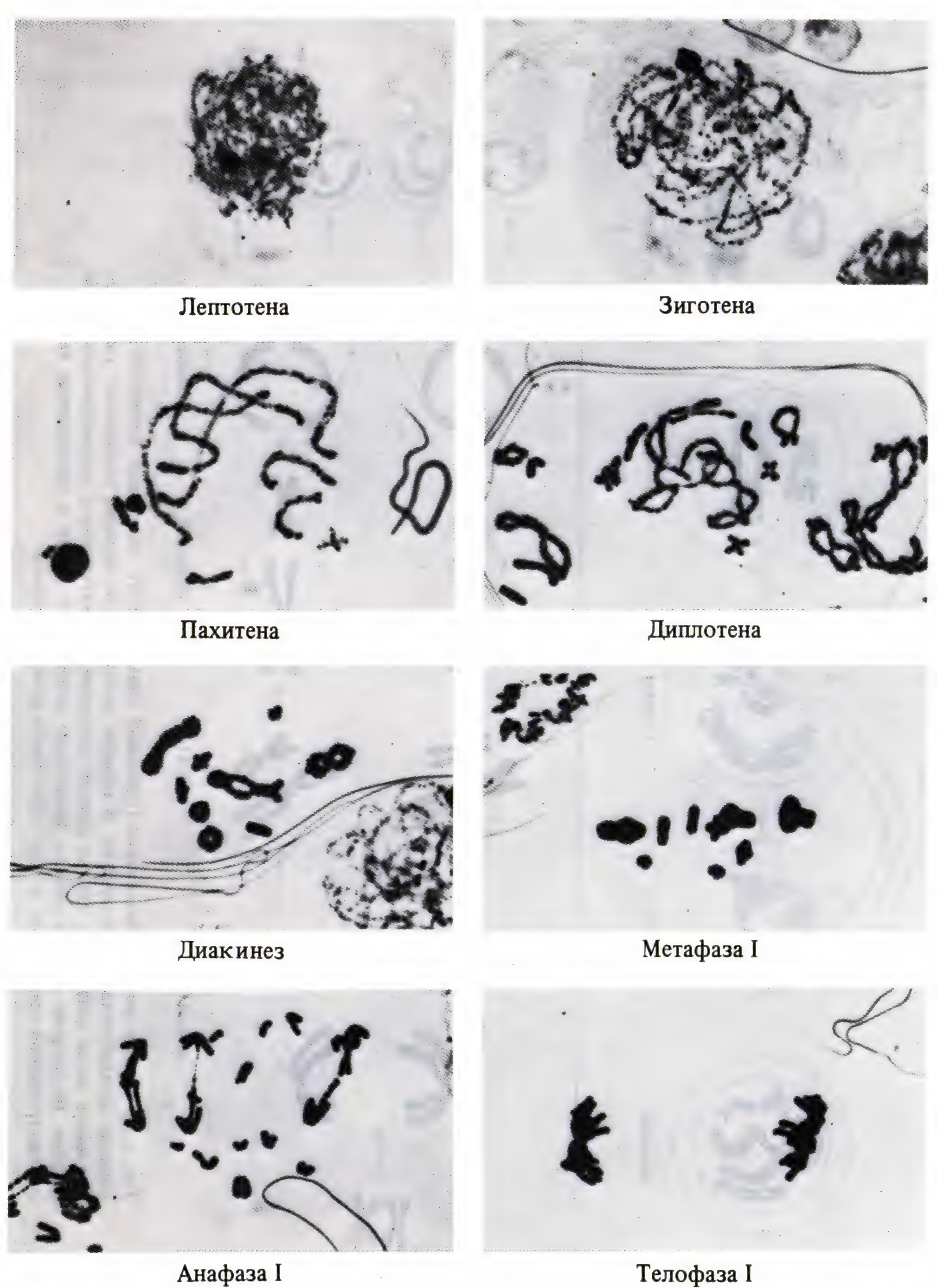


Рис. 1.12. Стадии мейоза. Репликация (удвоение) хромосомного материала происходит в S-периоде премейотической интерфазы. В первом мейотическом делении происходит уменьшение вдвое числа центромер, однако каждая центромера прикреплена к дуплицированной хромосоме. Во втором делении мейоза происходит деление центромер и превращение каждой дуплицированной хромосомы в пару самостоятельных хромосом.



Лептотена

Зиготена

Пахитена

Диплотена

Диакинез

Метафаза I

Анафаза I

Телофаза I

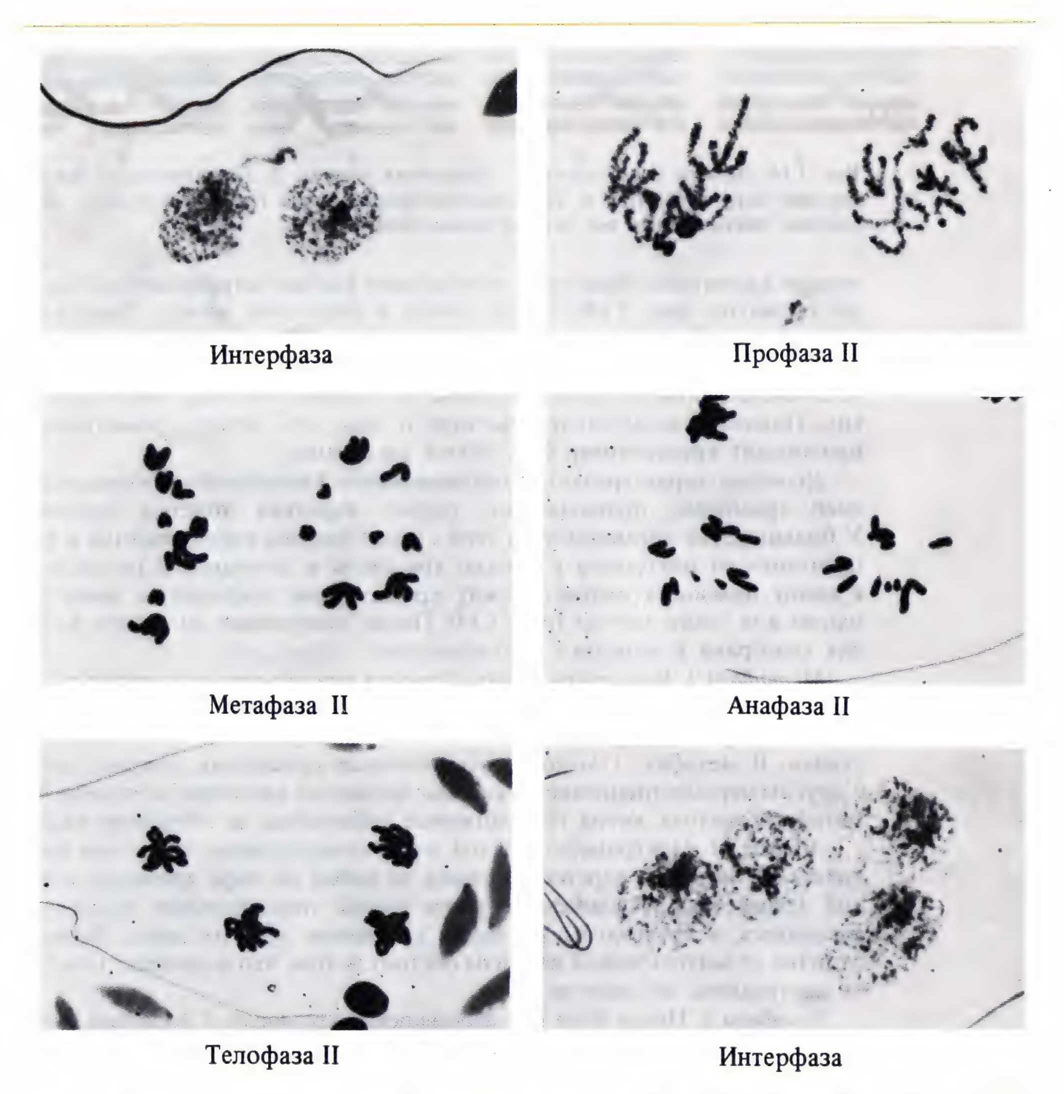


Рис. 1.13. Мейоз у самца кузнечика *Chorthippus parallelus*, $2N = 17$ (у самки $2N = 18$) ($\times$ 1500). Из четырех образовавшихся ядер (см. последнюю фотографию) два содержат по девять хромосом, а два – по восемь, поскольку в них отсутствует X-хромосома. (Prof. *James L. Walters*, University of California, Santa Barbara.)

нетическое событие, поскольку оно делает возможным обмен участками между гомологичными хромосомами, называемый *кроссинговером*. Две сцепленные таким образом хромосомы называются *бивалентом*. Бивалент, таким образом, состоит из четырех хроматид. Стадия *пахитены* характеризуется укорочением и утолщением бивалентов.

На стадии *диплотены* две гомологичные хромосомы почти расходятся, однако сестринские хроматиды, остаются соединенными общей центромерой. Кроме того, у гомологичных хромосом остаются одна или несколько зон контакта, которые называются *хиазмами*. Каждая хроматида может образовывать хиазмы с любой из хроматид гомологичной хромосомы, так что хиазмами могут быть связаны две, три или все

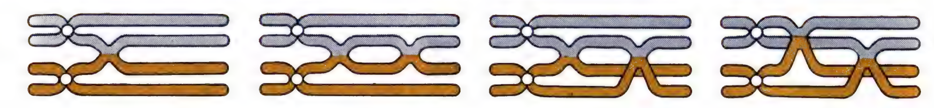


Рис. 1.14. Четыре типа хиазм. *А*. Одиночная хиазма. *Б*. Две хиазмы, затрагивающие пару хроматид. *В*. Две хиазмы, связывающие три хроматиды. *Г*. Две хиазмы, связывающие все четыре хроматиды.

четыре хроматиды бивалента, хотя каждая хиазма затрагивает лишь пару хроматид (рис. 1.14). Число хиазм в биваленте может быть различным, но обычно их бывает две-три. Например, в мейозе у человека (у женщин) в среднем можно наблюдать две-три хиазмы на бивалент, хотя число хиазм в длинных хромосомах обычно больше, чем в коротких. Наличие хиазм свидетельствует о том, что между хроматидами происходит кроссинговер (т. е. обмен участками).

Диакинез характеризуется максимальным утолщением и спирализацией хромосом, принимающих форму коротких толстых палочек. У большинства организмов на этой стадии хиазмы перемещаются в направлении от центромер к концам хромосом и исчезают. В результате к концу диакинеза контакт между хроматидами сохраняется лишь на одном или обоих концах (рис. 1.15). После завершения диакинеза ядерная мембрана и ядрышки растворяются.

Метафаза I. Биваленты прикрепляются центромерами к нитям веретена и собираются в метафазной пластинке, причем центромеры гомологичных хромосом располагаются на противоположных сторонах пластинки. В метафазе I мейоза гомологичные хромосомы связаны друг с другом переместившимися к концам хромосом хиазмами в отличие от метафазы митоза, когда гомологичные хромосомы не образуют пары.

Анафаза I. Центромеры каждой пары гомологичных хромосом расходятся к полюсам веретена, увлекая за собой по паре хроматид каждой хромосомы. Соединенные ранее концы гомологичных хромосом расходятся, и хромосомы все более удаляются друг от друга. Важное отличие от митотической анафазы состоит в том, что в анафазе I мейоза центромеры не делятся.

Телофаза I. После того как перемещение хромосом к полюсам веретена в анафазе завершено, вокруг каждого набора гомологичных хромосом образуется ядерная мембрана, и клетка делится на две дочерние.

Интерфаза между мейозом I и мейозом II обычно проходит быстро или отсутствует вовсе. Ее важное отличие от интерфазы, предшествующей мейозу I или митозу, состоит в том, что синтеза новой ДНК в промежутке между мейозом I и мейозом II не происходит.

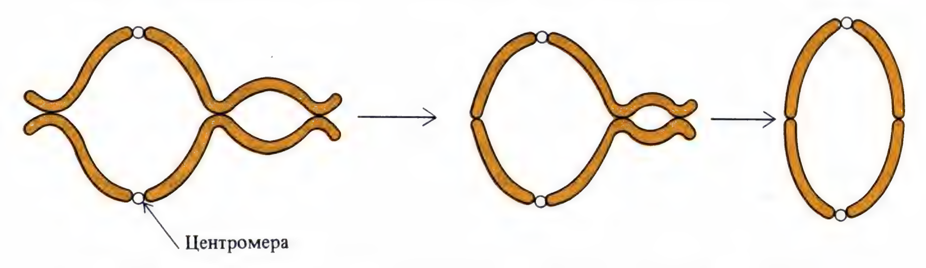


Рис. 1.15. Во время диакинеза хиазмы сдвигаются к концам бивалентов.

Мейоз II

К началу мейоза II хромосомы уже дуплицированы, и пары сестринских хроматид соединены общими центромерами. Однако каждая клетка содержит одинарный набор хромосом (*N*), а не двойной (2*N*), как в начале митоза или мейоза I. Профаза II часто проходит очень быстро. В метафазе II хромосомы прикрепляются центромерами к нитям веретена и располагаются в метафазной пластинке. К началу анафазы II каждая центромера делится (в первый и единственный раз в течение мейоза), и сестринские хроматиды таким образом становятся хромосомами, расходящимися затем к противоположным полюсам. Телофаза II завершается образованием ядерной мембраны вокруг каждого из двух гаплоидных ядер.

Мейоз I начинается в клетке, содержащей 2*N* *удвоенных* (*дуплицированных*) хромосом, и кончается образованием двух клеток (точнее, двух хромосомных комплексов, поскольку клеточное деление еще не совсем завершено), каждая из которых содержит по *N* *дуплицированных* хромосом. Мейоз II заканчивается образованием четырех клеток, каждая из

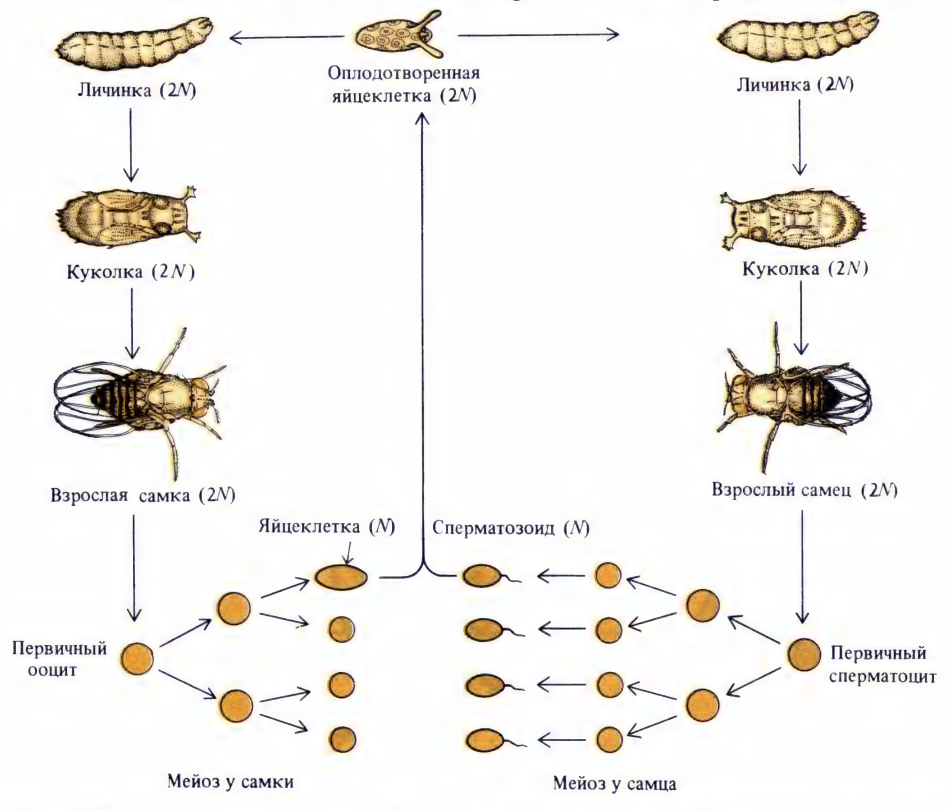


Рис. 1.16. Образование гамет у дрозофилы. Клетки зародышевой линии размножаются посредством митозов, а затем претерпевают мейоз и превращаются в ооциты (у самок) и в сперматоциты (у самцов). У самок лишь одна из четырех образующихся при мейозе клеток становится яйцеклеткой. Все четыре клетки, образующиеся в мейозе у самцов, называются сперматидами; в результате последующей дифференцировки они превращаются в сперматозоиды.

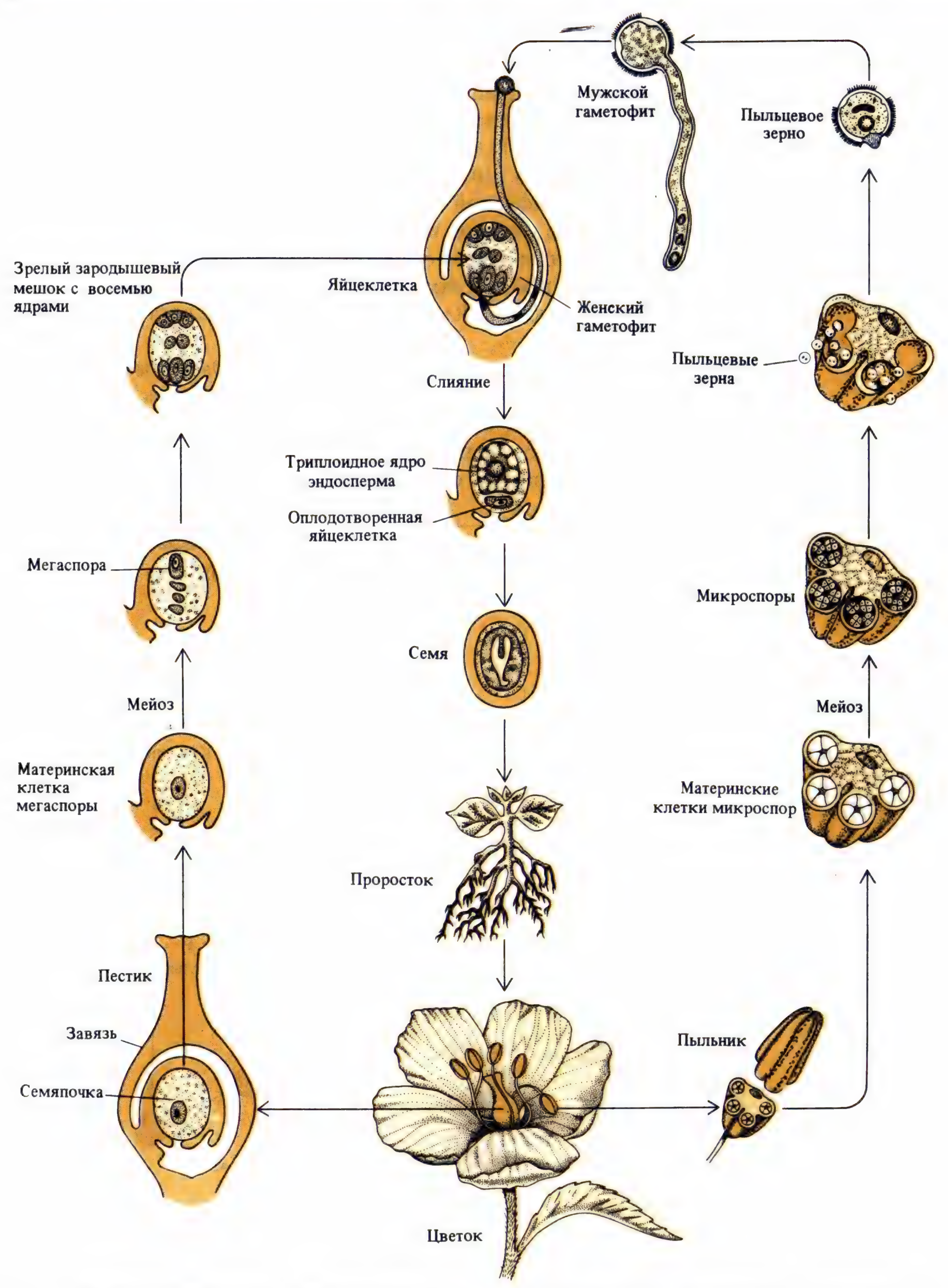


Рис. 1.17. Жизненный цикл и образование гамет у растения. У диплоида в результате мейоза происходит образование спор. Диплоидное растение называется *спорофитом*; гаплоидная фаза, включающая стадию созревания гамет, называется *гаметофитом*. Гаплоидная фаза может существовать в форме самостоятельного растения, независимого от диплоидной фазы. Например, у мхов гаметофиты представляют собой именно то, что мы называем мхом, тогда как спорофит представляет собой стебелек, живущий «паразитически» на гаметофите.

которых содержит по *N* одинарных хромосом. Клетки, образуемые таким образом в мужских репродуктивных органах животных, носят название *сперматозоидов*. У самок, однако, лишь одна из четырех образующихся в мейозе клеток является *яйцеклеткой*; остальные три клетки представляют собой *полярные тельца*, не способные выполнять функции гамет (рис. 1.16). У высших растений образующиеся в процессе мейоза мужские и женские половые клетки называются *микроспорами* и *мегаспорами* соответственно (рис. 1.17).

Значение мейоза

Митоз – это *эквационное* деление клетки, в результате которого хромосомные наборы дочерних клеток оказываются идентичными хромосомному набору родительской клетки. Иное дело мейоз: первое мейотическое деление является редукционным; второе – эквационным.

Мейоз I называется редукционным делением, поскольку число центромер и хромосом в клетках, образовавшихся в результате этого деления, вдвое меньше их числа в родительской клетке. Из каждой пары гомологичных хромосом родительской клетки одна из дочерних клеток получает отцовскую хромосому, а вторая – материнскую. Отцовская и материнская хромосомы могут содержать различную генетическую информацию; например, в отцовской хромосоме может содержаться информация «глаза карие, группа крови В», а в материнской – «глаза – голубые, группа крови О». Таким образом, клетки, возникшие в результате первого мейотического деления, генетически различны. Эти различия, однако, не всегда относятся к хромосоме в целом; каждый раз, когда несестринские хроматиды обмениваются участками, две хроматиды одной хромосомы становятся генетически различными (см. рис. 1.14).

С другой стороны, мейоз II – это эквационное деление, завершающееся делением центромер. Сестринские хроматиды – а, следовательно, и ядра, возникающие в результате мейоза II,– генетически идентичны (если не считать, как отмечалось в предыдущем абзаце, рекомбинантных участков). Существуют и некоторые другие различия между митозом и мейозом, которые можно видеть на рис. 1.18.

Генетическое значение мейоза можно суммировать следующим образом:

1. Мейоз обеспечивает постоянство числа хромосом у разных поколений организмов, размножающихся половым путем. Половое размножение включает стадию оплодотворения – слияния двух половых клеток или гамет. Если бы число хромосом в половых клетках было бы таким же, как и в соматических, то число хромосом удваивалось бы в каждом поколении.

2. В метафазе I каждая отцовская и материнская хромосома имеет равную вероятность оказаться по ту или другую сторону метафазной пластинки. Соответственно в каждой гамете могут оказаться как отцовские, так и материнские хромосомы. Если число хромосом значительно, то число возможных комбинаций сочетания отцовских и материнских хромосом в гамете очень велико, а вероятность того, что в определенную гамету попадут хромосомы только одного из родителей, очень мала. Рассмотрим, например, кариотип человека. В каждой нормальной клетке содержится 23 пары хромосом. Предположим, что первая отцовская хромосома оказалась по определенную сторону метафазной пла-

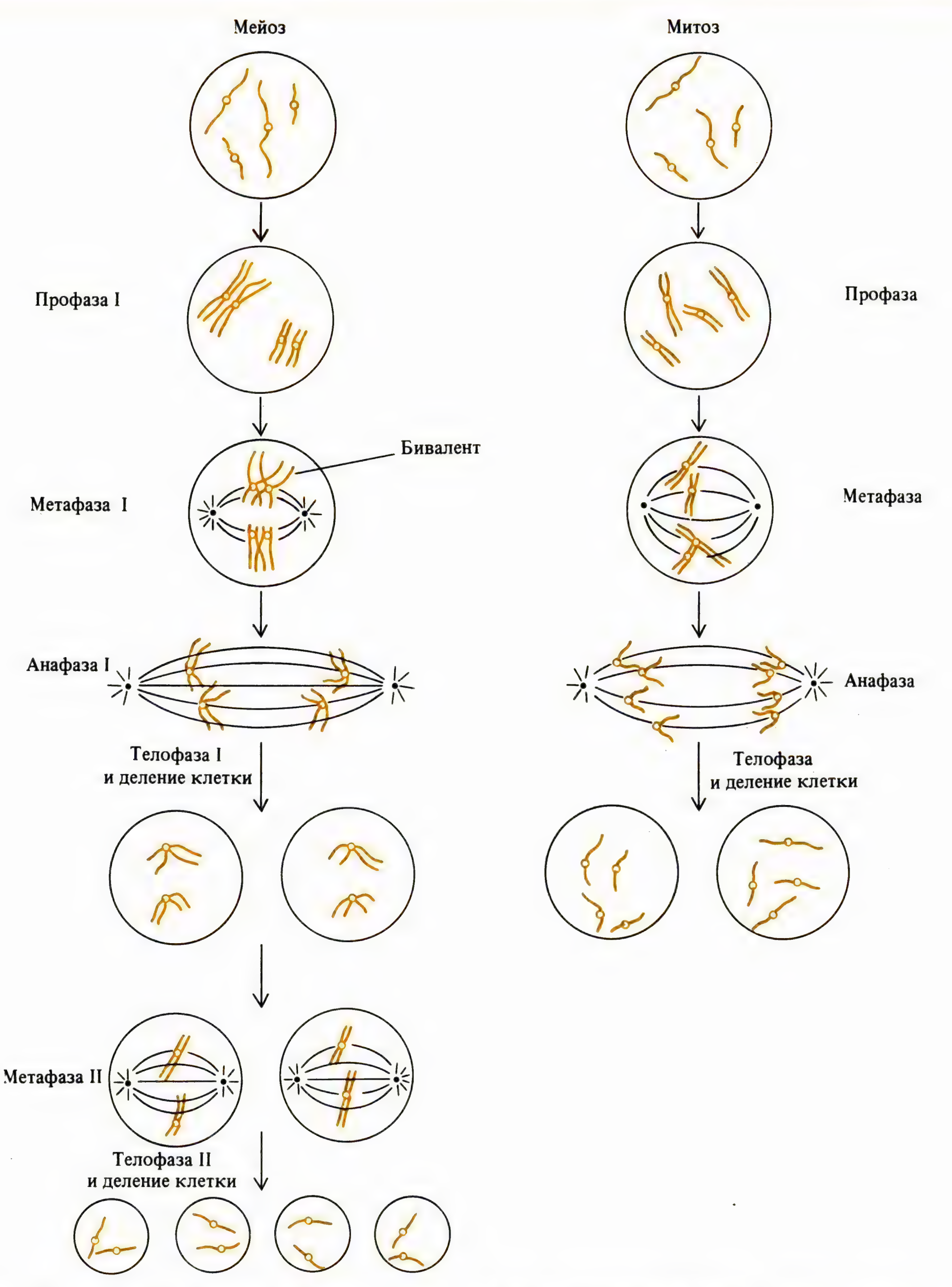


Рис. 1.18. Сравнение мейоза и митоза. В обоих случаях хромосомы однократно удваиваются, однако в мейозе происходит два клеточных деления, в результате чего число хромосом, приходящихся на одно ядро, уменьшается вдвое. Другое важное различие состоит в том, что в мейозе гомологичные хромосомы попарно объединяются, а в митозе – нет.

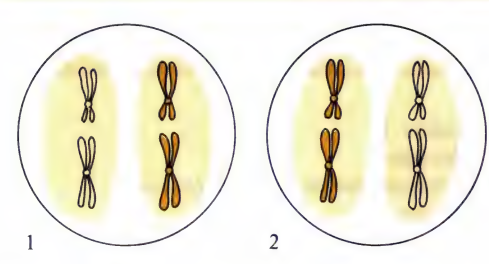
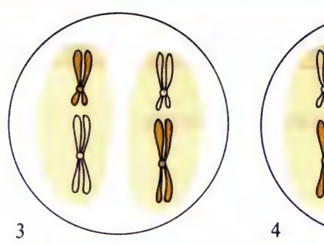
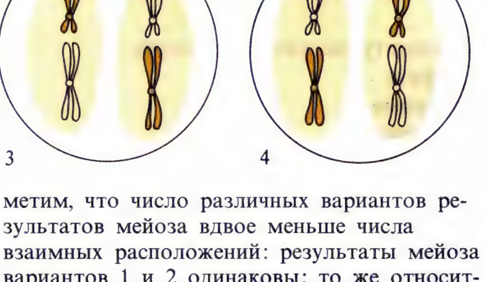




Рис. 1.19. Четыре возможных типа взаимного расположения двух пар хромосом в метафазной пластинке. Две хромосомы, направляющиеся вместе к одному и тому же полюсу веретена, расположены в одном пятне; материнские хромосомы выделены более темным цветом, отцовские – более светлым. При одной паре хромосом число вариантов взаимного расположения равно двум; при двух парах – четырем ($2^2 = 4$), при n парах число вариантов составляет 2^n. Заметим, что число различных вариантов результатов мейоза вдвое меньше числа взаимных расположений: результаты мейоза вариантов 1 и 2 одинаковы; то же относится и к вариантам 3 и 4. Вероятность того, что все отцовские (и соответственно все материнские хромосомы) направятся к одному полюсу веретена, равна $(1/2)^{n-1}$. Эта вероятность равна 1/2 для двух пар хромосом ($n = 2$), но быстро уменьшается с ростом числа хромосом.

стинки. Вероятность того, что по ту же сторону пластинки окажется вторая отцовская хромосома, равна $^1/_2$; то же самое справедливо для третьей, четвертой и всех остальных хромосом (рис. 1.19). Вероятность того, что все 23 отцовские хромосомы отойдут к одному полюсу, равна $(^1/_2)^{22} = {^1/_4}\,194\,304$, т. е. меньше одной четырехмиллионной.

3. Кроссинговер между несестринскими хроматидами еще больше перемешивает материнские и отцовские наследственные признаки в гаметах. В результате обмена участками между несестринскими хроматидами число различных типов гамет становится практически бесконечно большим. Напомним, что у человека в среднем на каждую хромосому приходится две-три хиазмы, а следовательно, два-три обмена участками хроматид. Границы этих участков от мейоза к мейозу варьируют, так что обмен генетическим материалом происходит каждый раз по-новому.

Литература

Beadle G., Beadle M., 1966. The Language of Life, An Introduction to the Science of Genetics, Doubleday, Garden City, N.Y.

Brachet J., Mirsky A.E., 1961. The Cell, vol. 3, Meiosis and Mitosis, Academic Press, New York.

Cairns J., Stent G.S., Watson J.D., eds., 1966. Phage and the Origins of Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Carlson E., 1966. The Gene: A Critical History, Saunders, Philadelphia.

Dunn L.C., 1965. A Short History of Genetics, McGraw-Hill, New York.

Luria S.E., Gould S.J., Singer S., 1981. A View of Life, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.

Margulis L. (1974). Five-kingdom classification and the origin and evolution of cells, Evol. Biol., **7**, 45–78.

Nagle J.J., 1981. Heredity and Human Affairs, Mosby, St. Louis.

Stubbe H., 1972. History of Genetics, MIT Press, Cambridge, Mass.

Sturtevant A.H., 1965. A History of Genetics, Harper and Row, New York.

Wilson E.O., Eisner T., Briggs W.R., Dickerson R.E., Metzenberg R.L., O'Brien R.D., Susman M., Boggs W.E., 1978. Life on Earth, 2nd ed., Sinauer, Sunderland, Mass.

Wolfe S.L., 1972. Biology of the Cell, Wadsworth, Belmont, Calif.

Ключевые слова и понятия

Акроцентрическая хромосома
Анафаза
Аутосома
Бактериофаг
Веретено
Вирус
Гамета
Гаплоид
Гетерогаметный пол
Гетерохроматин
Гомогаметный пол
Гомологичные хромосомы
Диплоид
Зигота
Интерфаза
Клеточный цикл
Кроссинговер
Мейоз
Мейоз I
Мейоз II
Метафаза
Метацентрическая хромосома
Митоз
Негомологичные хромосомы
Оплодотворение
Половые хромосомы
Прокариоты
Профаза
Синапсис
Соматическая клетка
Телофаза
Телоцентрическая хромосома
Хроматида
Хромосома
Центромера
Эукариоты
Эухроматин
Ядро

Задачи

1.1. Предположим, что мейоза не существует и оплодотворение у размножающихся половым путем организмов происходит в результате слияния двух соматических клеток с нормальным числом хромосом. Сколько хромосом будет у потомков организма с восемью хромосомами в пятом, десятом и сотом поколениях?

1.2. Перечислите общие черты и различия митоза и мейоза.

1.3. Нормальное число хромосом в клетках человека равно 46. Сколько хромосом содержат а) сперматозоиды, б) яйцеклетки, в) полярные тельца?

1.4. Нередко встречаются соматические клетки, число хромосом в которых отличается от числа хромосом в большинстве других соматических клеток. У человека, например, некоторые клетки печени содержат по 92 хромосомы. Как возникают такие клетки?

1.5. В потомстве каких организмов следует ожидать большего генетического разнообразия: размножающихся вегетативным или половым путем? Почему?

1.6. Предположим, что клетки некоторого организма содержат по три пары хромосом и каждая хромосома отличается от гомологичной одним морфологическим признаком (например, наличием или отсутствием перетяжки у одного из концов хромосомы). Сколько различных типов гамет по этому признаку может быть у такого организма?

2

Менделевская генетика

Первые представления о наследственности

Дети похожи на родителей, и хотя это сходство далеко не абсолютно, оно тем не менее явно свидетельствует о существовании биологической наследственности. Люди давно поняли, что половой акт и у человека, и у животных связан с размножением. Следовательно, естественно было предположить, что семя самцов служит носителем наследственности, однако, как именно это происходит, оставалось не ясно. Многие века господствовала теория *пангенеза*, согласно которой семя образуется во всех частях тела, а затем по кровеносным сосудам попадает через семенники в пенис. Сходство между родителями и потомством объяснялось тем, что семя, образуясь в различных частях тела, отражает характерные особенности каждой из них.

Теория пангенеза была известна уже Аристотелю (384–322 г. до н. э.) и другим древнегреческим философам и преобладала еще в XIX в. Жан Батист де Ламарк (1744–1829) считал пангенез основным механизмом эволюционных изменений. По Ламарку, эволюция была накоплением в чреде многих поколений благоприобретенных признаков: упражнение или неупражнение органов, по его мнению, приводят к таким изменениям в организме (например, развитие мускулатуры у спортсмена), которые могут передаваться потомству. Теория пангенеза принималась и другими великими биологами XIX века, включая Чарлза Дарвина (1809–1882).

Первый серьезный вызов теории пангенеза был брошен Августом Вейсманом (1834–1914), который противопоставил ей теорию *зародышевой плазмы.* Он провел различие между зародышевой плазмой, включающей половые клетки и клетки, из которых они образуются, и *соматоплазмой*, к которой отнес клетки остальной части организма. По

Вейсману, зародышевая плазма остается неизменной, передаваясь при размножении из поколения в поколение, тогда как соматоплазма преходяща и создается зародышевой плазмой лишь для того, чтобы защитить себя от повреждений и способствовать размножению. Эта точка зрения в корне противоречила теории пангенеза, в соответствии с которой семя слагается из частиц, выделяемых соматоплазмой и отражающих ее свойства. Вейсман подкрепил свою теорию экспериментом, который сегодня нам кажется несколько примитивным, но который, однако, оказал значительное влияние на последующее развитие представлений о наследственности. На протяжении многих поколений он отрезал хвосты мышам и обнаружил, что длина хвоста у их потомков остается неизменной. Из этого он заключил, что наследственные признаки хвоста определяются не частицами, формируемыми в самом хвосте; напротив, они определяются клетками зародышевой плазмы, которая при отрезании хвостов остается неизменной.

Открытие законов наследственности

Основные законы наследственности были открыты Грегором Менделем (1822–1884), монахом августинского монастыря, жившем в австрийском городе Брюнне (ныне Брно, Чехословакия). Примерно с 1856 г. он начал экспериментировать с горохом (*Pisum sativum*), для того чтобы узнать, как передаются по наследству индивидуальные признаки этого организма. Опыты Менделя и по сегодняшним меркам могут служить прекрасным образцом научного исследования. Результаты экспериментов он опубликовал в Известиях общества естественной истории в Брюнне в 1866 г., но его статья не привлекла никакого внимания ученых.

Законы Менделя были вторично открыты в 1900 году тремя учеными, получившими сходные с Менделем результаты и признавшими его приоритет. Это были Гуго де Фриз из Голландии, Карл Корренс из Германии и Эрих Чермак из Австрии. С этого момента для всех стало очевидным, насколько велико значение работы Менделя: именно им был открыт путь к разгадке тайны наследственности. Многие биологи

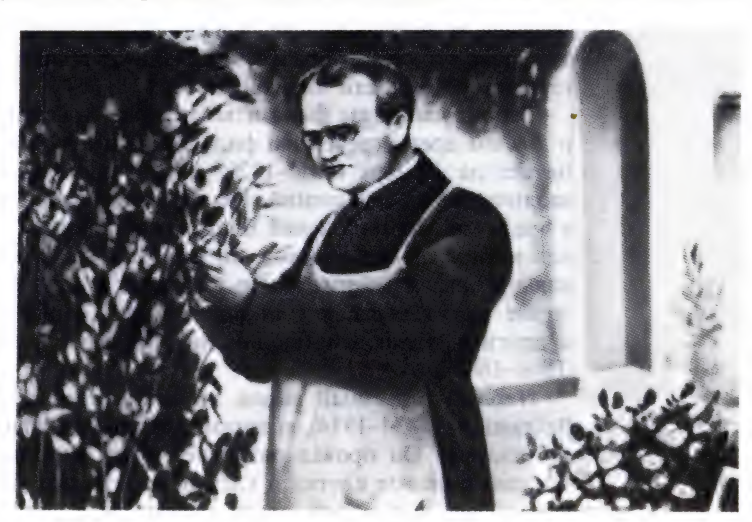


Рис. 2.1. Грегор Мендель – ученый, открывший фундаментальные законы наследственности.

заинтересовались генетикой. Первоочередной задачей было показать, что принципы Менделя приложимы не только к растениям, но и к животным. Это было сделано в первые же годы XX века в основном Люсьеном Кено во Франции, Вильямом Бэтсоном в Англии и Вильямом Кастлем в США. Вскоре последовали новые важные открытия.

Методы Менделя

До Менделя многие ученые пытались понять, как наследуются биологические признаки. Они скрещивали растения или животных и наблюдали

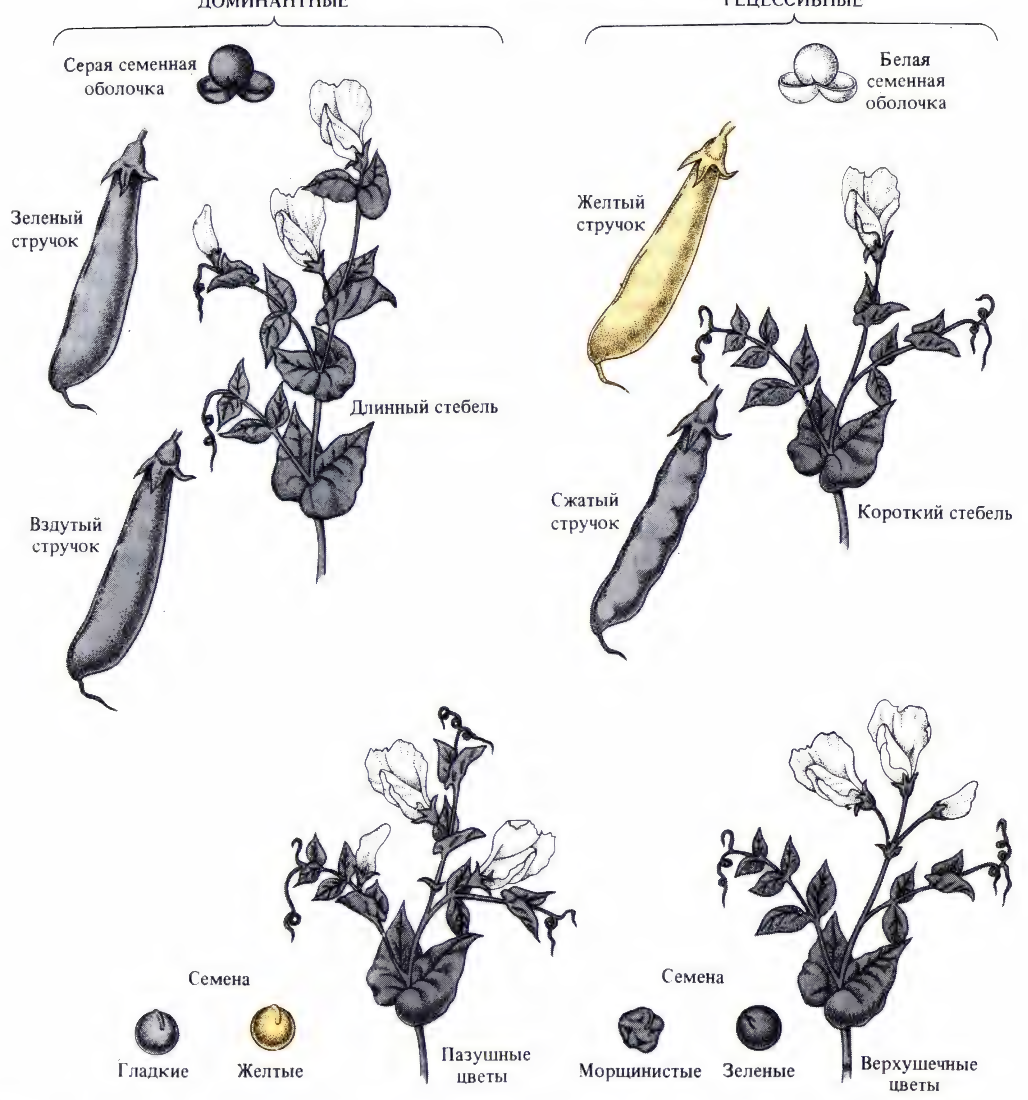


Рис. 2.2. Семь признаков гороха *Pisum sativum*, наследование которых изучал Мендель. Мендель использовал растения, четко отличающиеся по одному признаку.

сходство между родителями и потомством. Результаты были обескураживающими: одни признаки могли быть общими у потомка с одним родителем, другие – с другим, третьи – отличными от обоих родителей.

Глубокое проникновение в проблему и четкая методология обеспечили Менделю успех там, где его предшественники терпели неудачу. Он понял, что каждый раз следует концентрировать внимание на одном признаке, например на форме семян, а не на растении в целом. С этой целью он отобрал признаки, по которым растения четко отличались (рис. 2.2). Прежде чем скрещивать растения между собой, Мендель также убедился в том, что они принадлежат *чистым линиям*. Для этого он, получив от семеноводов множество различных разновидностей гороха, в течение двух лет разводил их, чтобы отобрать для своих опытов только те линии, в которых данный признак всегда воспроизводится в потомстве из поколения в поколение. Другой важной особенностью работы Менделя был количественный подход: он подсчитал число потомков разных типов, чтобы установить, с одинаковой ли частотой появляются носители альтернативных признаков.

Менделевский метод генетического анализа – подсчет числа особей каждого класса в потомстве, полученном от определенного типа скрещивания, – по-прежнему широко используется. Фактически до возникновения в 50-х годах молекулярной генетики этот метод оставался единственным методом генетического анализа. Кроме разработки замечательной методологии научная гениальность Менделя проявилась в его способности сформулировать теорию, объясняющую данные экспериментов, и поставить эксперименты, подтверждающие эту теорию. Хотя концепция Менделя была представлена, строго говоря, в качестве гипотезы, в действительности это была завершенная теория. Время показало ее фундаментальную полноту и правильность.

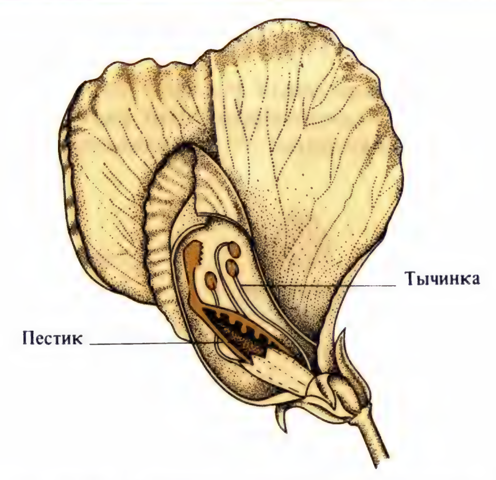
Рассмотрим теперь постановку экспериментов Менделя, основные законы наследственности, следующие из этих экспериментов, и теорию, которая объясняет эти законы и описывает результаты экспериментов.

Доминантность и рецессивность

Горох размножается самоопылением: растения устроены таким образом, что пыльца обычно попадает на рыльце пестика того же цветка и опыляет его (рис. 2.3). Однако довольно просто можно произвести перекрестное опыление. Для этого Мендель раскрывал бутоны и удалял тычинки с еще не созревшей пыльцой, предотвращая тем самым самоопыление, а затем опылял этот цветок пыльцой другого растения.

В одном из опытов Мендель изучал наследование формы семян, скрещивая растения с гладкими и морщинистыми горошинами. Результаты были однозначны: у всех гибридных растений первого поколения (F_1) семена оказались гладкими независимо от того, материнским или отцовским было растение с такими семенами. Морщинистость как бы маскировалась доминированием гладкости (рис. 2.4). Мендель обнаружил, что аналогичным образом ведут себя все семь признаков, отобранных им для исследования: в каждом случае у растений первого гибридного поколения проявлялся лишь один из двух альтернативных признаков. Мендель назвал такие признаки (гладкость семян, их желтый цвет, пазушные цветки и т. д.) *доминантными*, а альтернативные призна-

Рис. 2.3. Цветок гороха *Pisum sativum* (в разрезе). Хорошо видны женские (пестик) и мужские (тычинки) репродуктивные органы.



ки (морщинистые семена, зеленые семена, верхушечные цветки) он назвал *рецессивными.*

Позднее ученые установили, что доминирование одних признаков над другими представляет собой широко распространенное, но не универсальное явление. В некоторых случаях имеет место *неполное доминирование*: гибрид F_1 характеризуется признаком, промежуточным между родительскими. Например, у львиного зева цветки гибридных растений первого поколения от скрещивания родителей с малиновыми и белыми цветками всегда бывают розовыми. Так получается просто потому, что в розовых цветах красного пигмента меньше, чем в малиновых, а в белых цветах его нет вовсе. Бывает также, что в потомстве F_1 проявляются признаки обоих родителей; в таком случае говорят о *кодоминировании.* Например, если один из родителей имеет группу крови А, а другой – В, то в крови их детей присутствуют антигены, характерные и для группы А, и для группы В; наличие этих антигенов может быть установлено соответствующей (антигенной) реакцией.

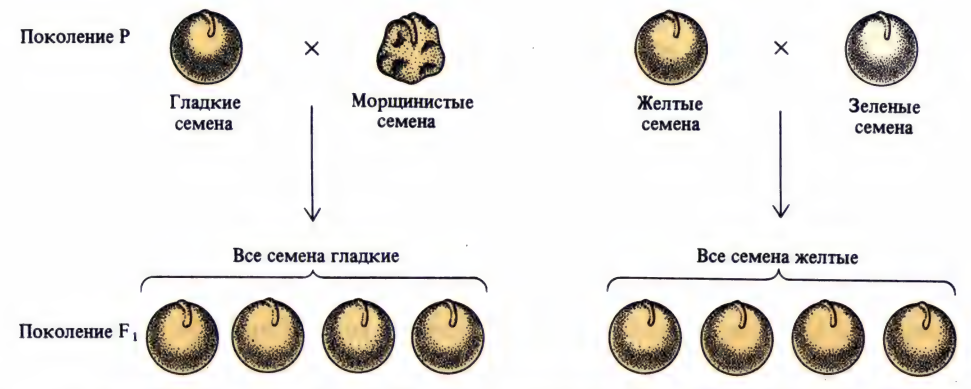


Рис. 2.4. Поколение F_1 в двух скрещиваниях Менделя. У гибридов первого поколения проявляется признак одного из родителей (доминантный), а альтернативный (рецессивный) признак второго родителя как бы маскируется. Результаты скрещивания не зависят от того, какое растение, отцовское или материнское, является носителем доминантного признака.

Расщепление

Мендель выращивал растения из семян гибридов первого поколения и допускал самоопыление этих растений. В полученном таким образом втором поколении от скрещивания между растениями с гладкими

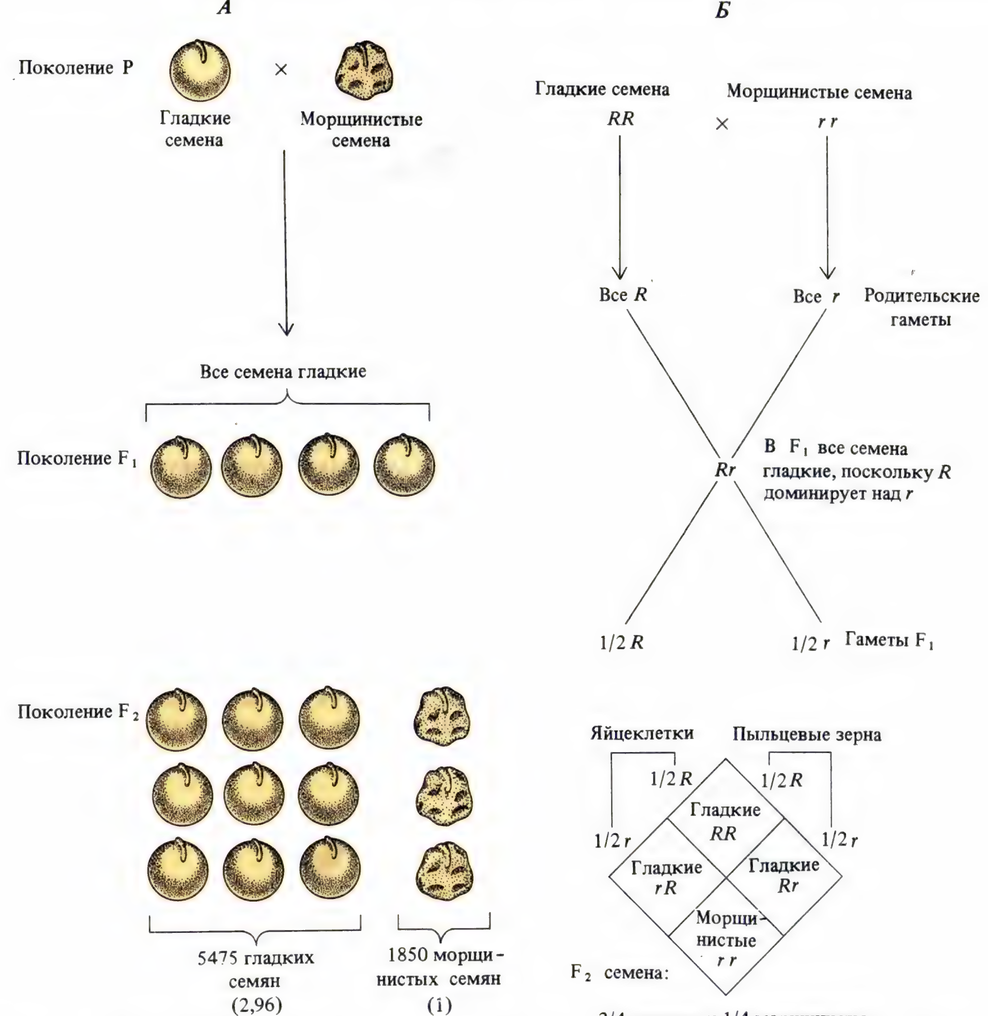


Рис. 2.5. Гибриды второго поколения (F_2) от скрещивания гороха с гладкими и морщинистыми семенами. *А*. При самоопылении растений F_1 с гладкими семенами или при перекрестном опылении между такими растениями в поколении F_2 примерно три четверти растений имеют гладкие семена, а одна четверть – морщинистые. *Б*. Предложенное Менделем объяснение. Буквы *R* и *r* обозначают альтернативные факторы (аллели), ответственные за гладкость и морщинистость семян соответственно. Вероятность появления любого типа растений можно узнать, перемножив вероятности для типов гамет, слияние которых приводит к формированию данного типа растений. Так, например, вероятность появления в F_2 растения типа *RR* равна одной четверти, поскольку с вероятностью 1/2 аллель *R* содержится в отцовской гамете и с такой же вероятностью – в материнской; откуда $(1/2)\cdot(1/2) = 1/4$.

Таблица 2.1. Результаты опытов Менделя по скрещиванию растений гороха, различающихся по одному из семи признаков

Признак*	F_1	F_2 (количество)			F_2 (%)	
		Доминантные	Рецессивные	Всего	Доминантные	Рецессивные
Семена: гладкие либо морщинистые	Гладкие	5475	1850	7325	74,7	25,3
Семена: желтые либо зеленые	Желтые	6022	2001	8023	75,1	24,9
Цветы: фиолетовые либо белые	Фиолетовые	705	224	929	75,9	24,1
Цветы: пазушные либо верхушечные	Пазушные	651	207	858	75,9	24,1
Бобы: («стручки») выпуклые либо с перетяжками	Выпуклые	882	299	1181	74,7	25,3
Бобы: зеленые либо желтые	Зеленые	428	152	580	73,8	26,2
Стебель: длинный либо короткий	Длинный	787	277	1064	74,0	26,0
Всего или в среднем		14 949	5010	19 959	74,9	25,1

* Доминантные признаки всегда указаны первыми.

и морщинистыми семенами встречались как гладкие, так и морщинистые горошины; более того, разные горошины оказывались сидящими бок о бок в одних и тех же «стручках». Мендель подсчитал: на 5475 гладких семян пришлось 1850 морщинистых (рис. 2.5). Это отношение очень близко к 3 : 1 (точнее, 2,96 : 1). Близкие отношения наблюдались и при других скрещиваниях: каждый раз в поколении F_2 растений с доминантным признаком оказывалось примерно втрое больше, чем с рецессивным (табл. 2.1).

Теперь Мендель мог определить, размножаются ли растения с гладкими и морщинистыми семенами из F_2 в чистоте, т. е. сохраняются ли эти признаки при самоопылении у всех потомков F_2 в следующих поколениях. Он проращивал семена F_2 и предоставлял получившимся растениям возможность самоопыляться. У растений, выросших из морщинистых семян, семена всегда были морщинистыми. Однако растения, полученные из гладких семян, вели себя совершенно иначе. Оказалось, что гладкие семена бывают двух типов, внешне совершенно неразличимых: примерно одна треть из них дает растения с такими же семенами, а в потомстве гладких семян другого типа (они составляют $^2/_3$) гладкие и морщинистые семена встречаются в соотношении 3 : 1. Таким образом, одна треть гладких семян из F_2 (или одна четверть всех семян в F_2) в следующем поколении не дает расщепления, тогда как остальные две трети (или половина всех семян в F_2) ведут себя так же, как семена из первого гибридного поколения F_1: из них вырастают растения, в которых гладкие и морщинистые семена встречаются в соотношении 3 : 1.

Такие же результаты были получены и для других пар признаков. Во всех случаях растения с рецессивным признаком из F_2 размножались в чистоте: их потомки в следующем поколении (F_3) имели тот же фенотип. Что касается носителей доминантных признаков в F_2, то они были двух типов: одна треть разводилась в чистоте, а в потомстве остальных

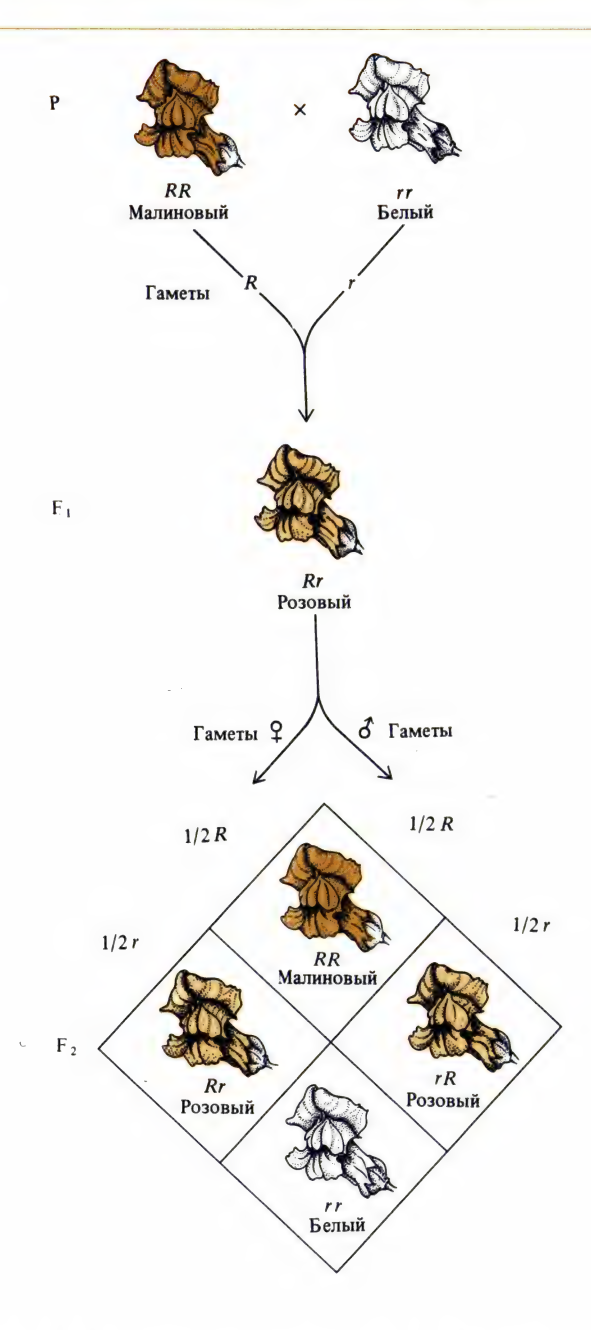


Рис. 2.6. Скрещивание между растениями львиного зева с белыми и малиновыми цветами. В F_1 цветы розовые, что свидетельствует о неполном доминировании малиновой окраски над белой. В F_2 растения с малиновыми, розовыми и белыми цветами представлены в отношении 1 : 2 : 1.

двух третей в F_3 носители доминантного и рецессивного признаков встречались в соотношении 3 : 1.

Впоследствии было доказано, что результаты Менделя справедливы и для растений, и для животных, и человека. В случаях кодоминирования или неполного доминирования поколение F_2 состоит из трех классов: в четверти случаев проявляется признак одного родителя, в другой

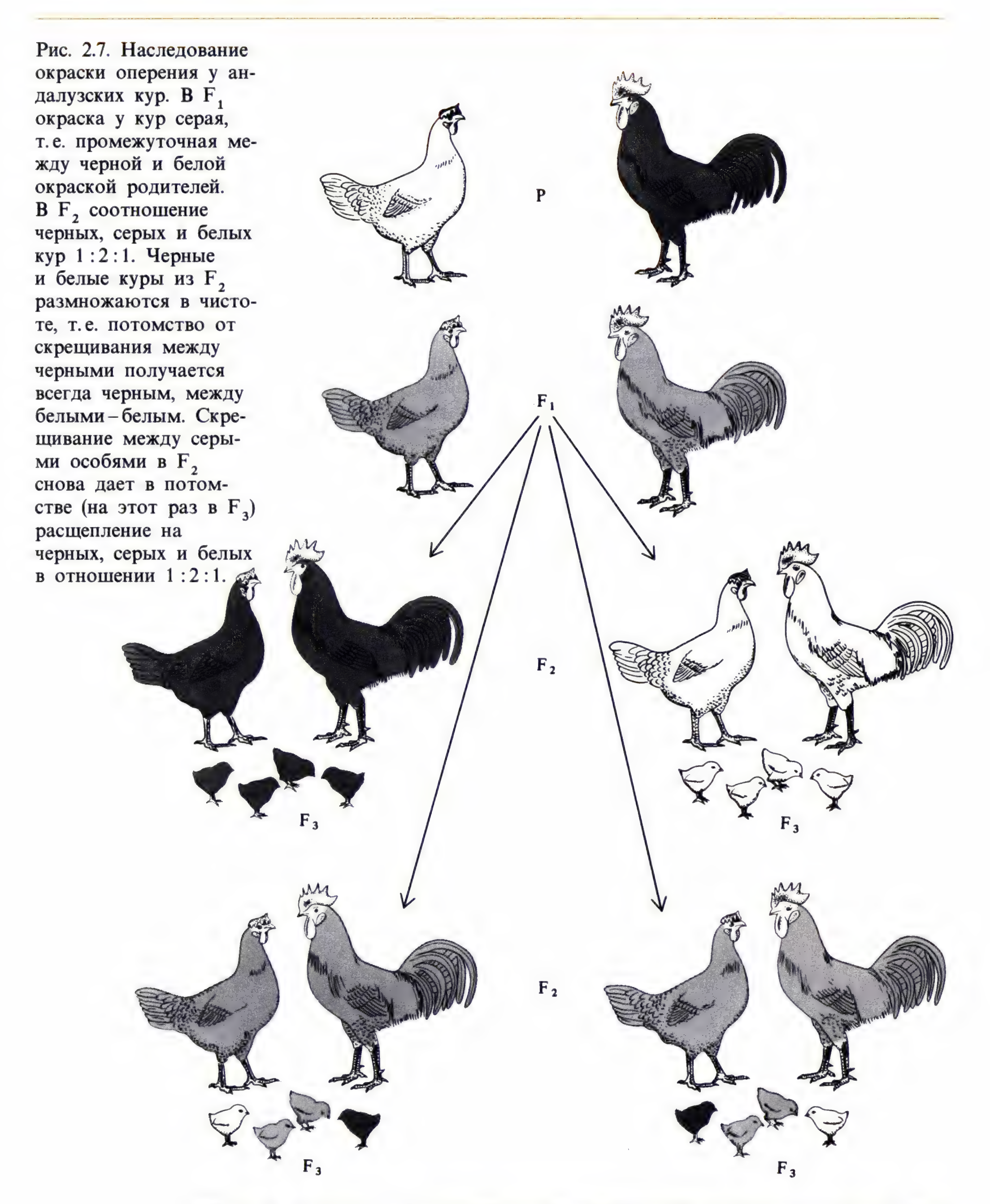


Рис. 2.7. Наследование окраски оперения у андалузских кур. В F_1 окраска у кур серая, т.е. промежуточная между черной и белой окраской родителей. В F_2 соотношение черных, серых и белых кур 1:2:1. Черные и белые куры из F_2 размножаются в чистоте, т.е. потомство от скрещивания между черными получается всегда черным, между белыми – белым. Скрещивание между серыми особями в F_2 снова дает в потомстве (на этот раз в F_3) расщепление на черных, серых и белых в отношении 1:2:1.

четверти – второго, а половину составляют особи, которые выглядят так же, как гибриды F_1. При этом особи, похожие на родителей, не дают в потомстве расщепления, тогда как при скрещивании гибридных особей в F_3 наблюдается такое же расщепление; по одной четверти особей совпадают по фенотипу с каждым из родителей, а половина особей имеет гибридное проявление признака (рис. 2.6 и 2.7).

Гены – носители наследственности

Для объяснения результатов своих опытов с горохом Мендель выдвинул следующую гипотезу. Альтернативные признаки, такие как гладкость и морщинистость семян, определяются некими факторами (теперь их называют *генами*), передающимися от родителей потомкам с гаметами; каждый фактор может существовать в одной или нескольких альтернативных формах (ныне называемых *аллелями*), каждая из которых ответственна за одну из возможных альтернативных форм проявления признака. В каждом растении гороха содержатся два гена, обусловливающие проявление любого признака; один получен от отцовского растения, а другой – от материнского. Таким образом, в каждом растении гороха есть два гена, влияющие на форму семян; каждый из них может быть либо в форме, определяющей гладкость горошин (аллель гладкости), либо в форме, определяющей их морщинистость (аллель морщинистости).

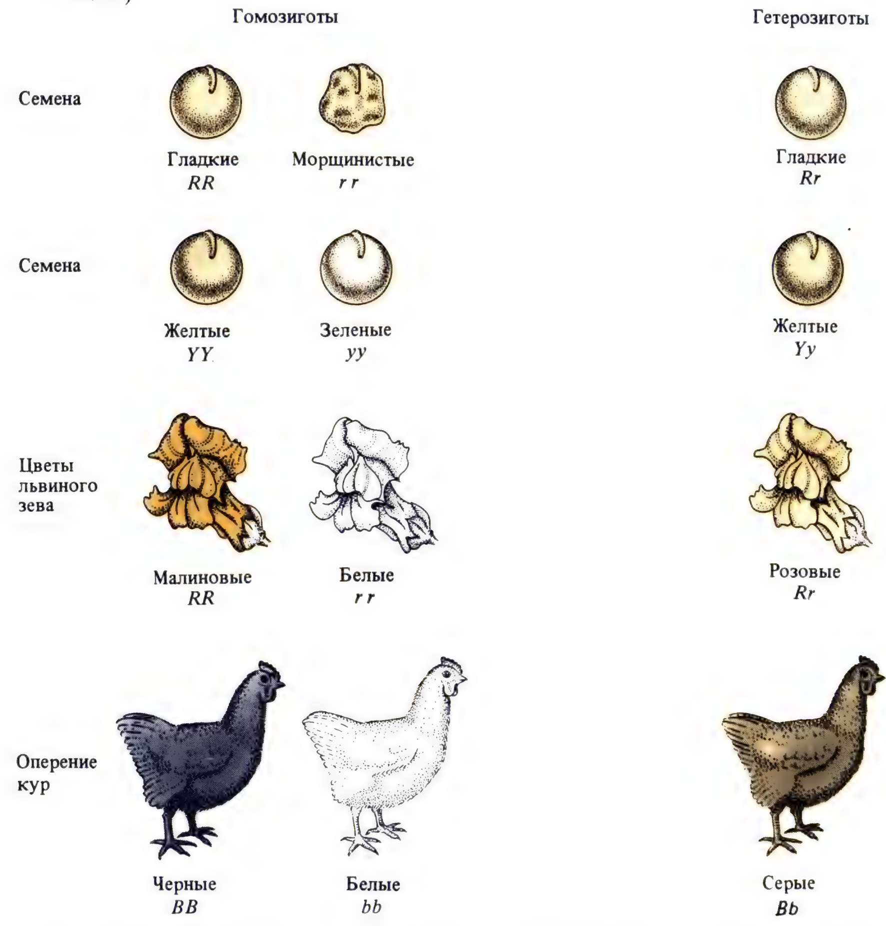


Рис. 2.8. Гомозиготные и гетерозиготные особи различных видов организмов. Гомозиготы имеют два идентичных аллеля гена, определяющего данный признак; у гетерозиготы аллели разные.

Здесь нам следует ввести еще два генетических термина. *Гомозиготой* (или гомозиготной) называется особь, у которой два гена, определяющие данный признак, идентичны, т. е. особь с идентичными аллелями. *Гетерозиготой* (или гетерозиготной) называется особь, у которой два гена, определяющие данный признак, различны, т. е. особь содержит два разных аллеля. Таким образом, размножающиеся в чистоте растения с гладкими семенами гомозиготны по этому признаку, а растения с морщинистыми семенами, в потомстве которых все семена морщинистые, гомозиготны по данному признаку. Гибриды F_1 от скрещивания между растениями, гомозиготными по гладкости и морщинистости, гетерозиготны по соответствующим аллелям (рис. 2.8).

Единообразие гибридов первого поколения привело Менделя к заключению, что в гетерозиготных особях один аллель доминантен, а другой рецессивен. Из того факта, что в потомстве гибридов (гетерозигот) встречаются носители обоих родительских признаков, Мендель сделал вывод, что *два фактора (гена), определяющие альтернативные проявления признака, никоим образом не сливаются друг с другом, а остаются раздельными на протяжении всей жизни особи и при формировании гамет расходятся в разные гаметы*, так что половина гамет получает один ген, а половина – второй. Это утверждение называется *законом расщепления Менделя*.

Пары генов часто обозначают буквами, причем для обозначения доминантного аллеля используется прописная буква латинского алфавита, а для рецессивного – соответствующая строчная. Например, аллель гладкости семян обычно обозначается буквой *R*, а аллель морщинистости – буквой *r*. Соответственно гомозиготные растения с гладкими семенами получают обозначение *RR*, а с морщинистыми – *rr*. Гибриды первого поколения F_1 записываются как *Rr*; они производят гаметы двух типов *R* и *r* в равных количествах. При самоопылении растения с генотипом *Rr* (или при его опылении пыльцой такого же растения) возни-

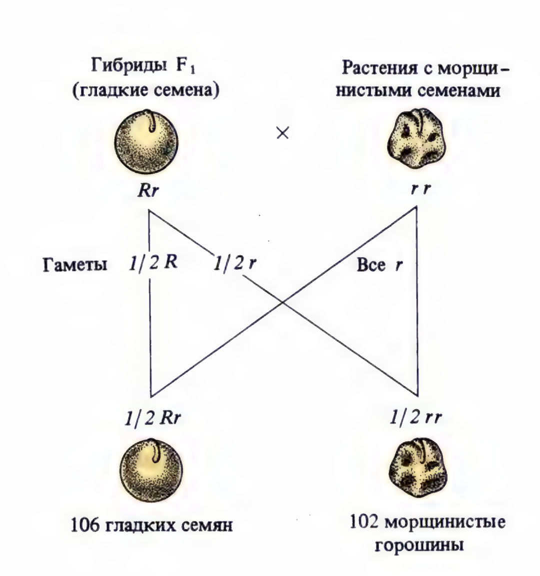


Рис. 2.9. Анализирующим скрещиванием называется скрещивание гибрида F_2 с рецессивным родителем. На рисунке представлены результаты скрещивания гибрида F_1 между формами с гладкими и морщинистыми семенами (*Rr*) с растением, обладающим морщинистыми горошинами (*rr*). Мендель обнаружил, что в таком скрещивании в соответствии с его гипотезой примерно половина потомков имеет гладкие семена, как гибридный родитель, а вторая половина – морщинистые, как рецессивный родитель.

кают потомки трех типов: (1) $^1/_4$ – это растения с гладкими семенами, не дающие в потомстве расщепления (*RR*); (2) половину потомства составляют растения с гладкими семенами, которые, однако, при самоопылении дают в потомстве (т.е. в поколении F_3) растения как с гладкими, так и с морщинистыми семенами (*Rr*), и, наконец, (3) одна четверть растений имеет морщинистые семена. Это гомозиготы *rr*, они производят гаметы одного-единственного типа.

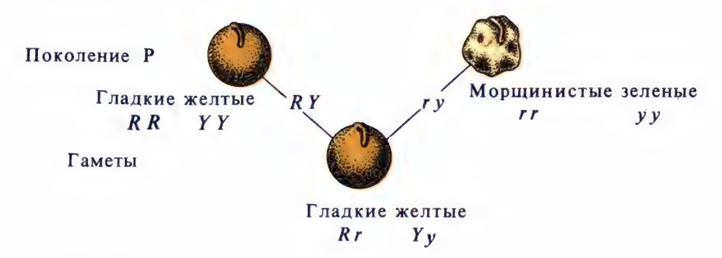
Мендель проверял свою гипотезу различными способами. Один из них, впоследствии широко применявшийся генетиками, называется *анализирующим скрещиванием* (рис. 2.9). Для этого гибридные особи F_1 скрещивают с их рецессивным родителем. Если гипотеза Менделя справедлива, то в потомстве от такого скрещивания особи с рецессивным и доминантным признаками должны быть представлены примерно в одинаковом количестве. Результат полностью соответствовал ожидаемому.

Независимое комбинирование

Описанные нами опыты Менделя относятся лишь к наследованию альтернативных проявлений одного признака. А что происходит, когда одновременно рассматриваются два признака? Мендель сформулировал *закон независимого комбинирования*, который гласит, что *гены, определяющие различные признаки, наследуются независимо друг от друга.* (Впоследствии, однако, было показано, что этот закон справедлив только для генов, находящихся в разных хромосомах.)

Мендель вывел этот закон из результатов скрещивания растений, отличавшихся по двум различным признакам (такое скрещивание называется *дигибридным*). В одном из опытов растения с гладкими желтыми семенами он скрещивал с растениями, семена которых были морщинистыми и зелеными. Как и следовало ожидать, в F_1 семена всех растений были гладкими и желтыми. Очень интересные результаты были получены при анализе гибридов второго поколения (F_2). Мендель заранее рассмотрел две возможности: (1) признаки, наследуемые от каждого родителя, передаются потомству вместе; (2) признаки передаются независимо друг от друга. Со свойственной ему четкостью Мендель сформулировал следствия, вытекающие из этих альтернативных гипотез. Если справедлива первая гипотеза, то в F_2 должны быть только два типа растений – с гладкими желтыми семенами и с морщинистыми зелеными, причем в соответствии с законом расщепления эти два типа растений должны быть представлены в отношении 3 : 1. Если же справедлива вторая гипотеза, то семена должны быть четырех типов: гладкие желтые (два доминантных признака), гладкие зеленые (доминантный и рецессивный), морщинистые желтые (рецессивный и доминантный) и морщинистые зеленые (два рецессивных признака). Численности соответствующих классов должны находиться в соотношении 9 : 3 : 3 : 1 (рис. 2.10).

Мендель обнаружил, что в поколении F_2 присутствуют четыре типа семян, а именно: 315 гладких желтых, 108 гладких зеленых, 101 морщинистое желтое и 32 морщинистых зеленых. Этот результат довольно хорошо совпадал с предсказанным на основе второй гипотезы отношением 9 : 3 : 3 : 1, и Мендель пришел к заключению, что гены, определяющие различные признаки, передаются от родителей потомками независимо. (Заметим, что результаты этого опыта подтверждают также закон



Поколение F_1

Гаметы

Яйцеклетки

Пыльцевые зерна

¼ RY ¼ rY ¼ Ry ¼ ry

¼ RY ¼ rY ¼ Ry ¼ ry

RRYY

RrYY RrYY

RRYy rrYY RRYy

RrYy RrYy RrYy RrYy

rrYy RRyy rrYy

Rryy Rryy

rryy

Гладкие желтые

Морщинистые желтые

Гладкие зеленые

Морщинистые зеленые

Поколение F_2

$$\frac{1}{16}(RR\,YY) + \frac{2}{16}(Rr\,YY) + \frac{2}{16}(RR\,Yy) + \frac{4}{16}(Rr\,Yy) = \frac{9}{16}$$ гладких и желтых семян

$$\frac{1}{16}(RR\,yy) + \frac{2}{16}(Rr\,yy) = \frac{3}{16}$$ гладких и зеленых семян

$$\frac{1}{16}(rr\,YY) + \frac{2}{16}(rr\,Yy) = \frac{3}{16}$$ морщинистых и зеленых семян

$$\frac{1}{16}(rr\,yy) = \frac{1}{16}$$ морщинистых и желтых семян

Рис. 2.10. Независимое комбинирование. Растения с гладкими желтыми семенами (*RRYY*) скрещивали с растениями, семена которых были морщинистыми и зелеными (*rryy*). В поколении F_1 растения имели гладкие желтые семена (*RrYy*). У них возникают гаметы четырех типов, частота каждого составляет 1/4. Случайное сочетание четырех типов мужских и женских гамет дает в F_2 девять различных генетических классов. Схема образования различных типов зигот из гамет представлена на рисунке. С точки зрения внешнего проявления признаков из 16 клеточек девять соответствуют гладким желтым горошинам, три – гладким зеленым, три – морщинистым желтым и одна – морщинистым зеленым. Таким образом, эти четыре типа должны быть представлены в отношении 9 : 3 : 3 : 1. У Менделя число растений соответствующих типов составляло 315, 108, 101 и 32, что хорошо соответствует предсказаниям гипотезы.

расщепления, поскольку ожидаемое отношение 3 : 1 хорошо соблюдается для каждого отдельно взятого признака. В поколении F_2 гладких семян оказалось 423, а морщинистых – 133; соотношение желтых и зеленых составило 416 : 140.)

Тригибридные скрещивания

Мендель проверял закон независимого комбинирования на различных комбинациях пар признаков. Он подтвердил также этот закон, поставив опыт по скрещиванию растений, отличавшихся сразу по трем признакам. Такое скрещивание называется *тригибридным*.

Рассмотрим, например, скрещивание между двумя растениями гороха со следующими признаками:

Материнское растение:	Отцовское растение:
гладкие семена (*RR*)	морщинистые семена (*rr*)
желтые семена (*YY*)	зеленые семена (*yy*)
пурпурные цветы (*CC*)	белые цветы (*cc*)

Материнское растение продуцирует гаметы типа *RYC*, отцовское – *ryc*, следовательно, гибриды F_1 будут тройными гетерозиготами или тригибридами, принадлежащими к генетическому типу *Rr Yy Cc*. Вследствие доминантности семена у таких растений будут гладкими и желтыми, а цветы – пурпурными. Если все гены передаются независимо, то в тригибридном растении образуется восемь типов гамет, причем все с равной вероятностью (рис. 2.11).

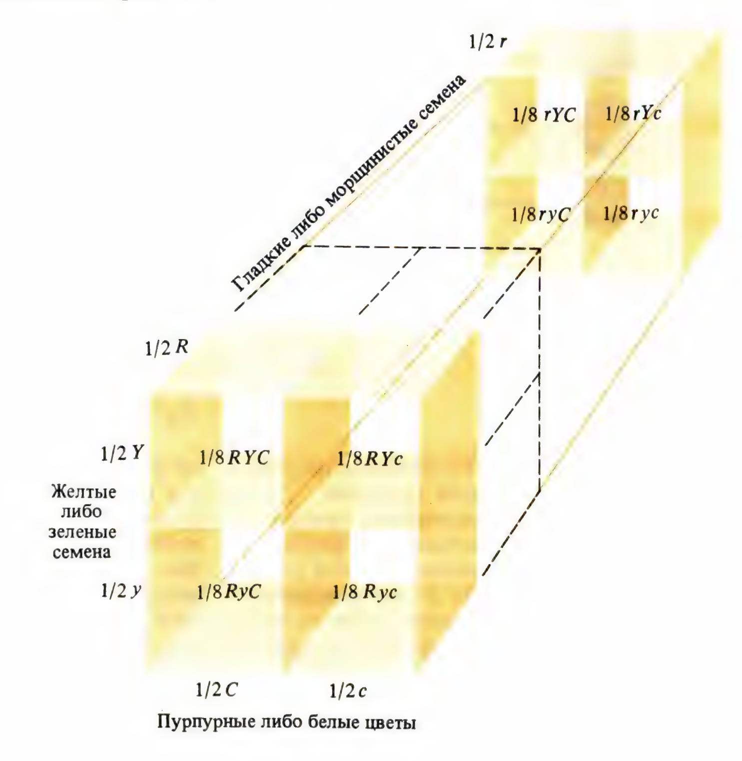


Рис. 2.11. Гаметы, образующиеся у тригибридной особи. В отношении каждого гена вероятность одного из двух типов гамет равна 1/2. При одновременном рассмотрении всех трех генов возможны восемь типов гамет. Если все гены наследуются независимо, то вероятность каждого типа гамет составляет $(1/2) \cdot (1/2) \cdot (1/2) = 1/8$.

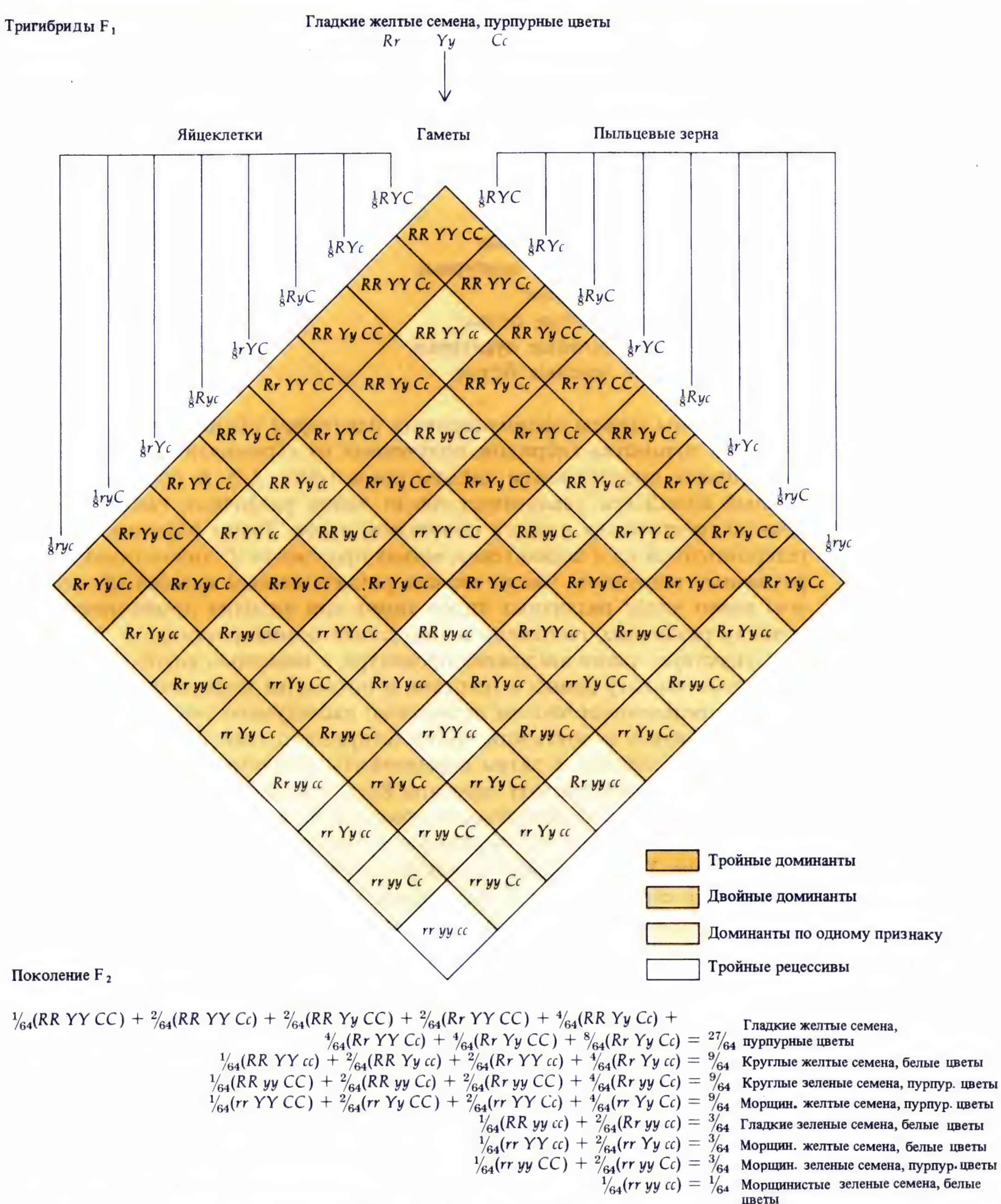


Рис. 2.12. Генотипы, возникающие в потомстве тригибридных особей при их самоопылении или перекрестном опылении. Существуют 64 комбинации восьми отцовских и восьми материнских гамет, но соответствуют они лишь 27 различным генотипам. В рассмотренном на схеме случае доминирования эти 27 генотипов соответствуют восьми различным фенотипам. В опытах Менделя тригибридные растения могли быть получены в результате скрещивания растений с гладкими желтыми семенами и пурпурными цветами и растений с морщинистыми зелеными семенами и белыми цветами.

Случайное слияние гамет восьми типов от двух родителей приводит к возникновению 27 различных генетических классов (рис. 2.12). Вследствие доминантности этим 27 генетическим классам соответствуют всего лишь 8 типов внешне различающихся растений, представленных в следующем отношении (названия доминантных признаков выделены жирным шрифтом):

27 **гладкие желтые пурпурные**
9 **гладкие желтые** белые
9 **гладкие** зеленые **пурпурные**
9 морщинистые **желтые пурпурные**
3 **гладкие** зеленые белые
3 морщинистые **желтые** белые
3 морщинистые зеленые **пурпурные**
1 морщинистые зеленые белые

Теперь мы можем сформулировать некоторые общие правила относительно потомства гибридов, полученных от скрещивания особей, отличающихся определенным числом генов (табл. 2.2). В общем случае каждый новый ген увеличивает число типов различных гамет вдвое, а число генетических классов (*генотипов*) втрое. Таким образом, особь, гетерозиготная по n парам генов, может произвести 2^n типов гамет и 3^n различных генотипов. Число внешне различающихся классов (*фенотипов*) равно числу различных типов гамет при наличии доминирования и числу различных генотипов в отсутствие доминирования.

Существует также несложная процедура, с помощью которой можно вычислить частоту данного генотипа в потомстве родителей, отличающихся определенным числом независимо наследуемых генов. Для этого надо подсчитать вероятности соответствующего генотипа для каждой пары генов отдельно, а затем перемножить. Допустим, мы хотим рассчитать ожидаемую частоту генотипа *RryyCc* в потомстве от скрещивания *RrYycc* × *RrYyCc*. Вероятность генотипа *Rr* в потомстве от скрещивания *Rr* × *Rr* равна $^1/_2$; вероятность генотипа *yy* в потомстве от скрещивания *Yy* × *Yy* равна $^1/_4$; наконец, вероятность генотипа *Cc* в потомстве от скрещивания *cc* × *Cc* равна также $^1/_2$. Следовательно, вероятность генотипа *RryyCc* составляет $(^1/_2)\cdot(^1/_4)\cdot(^1/_2) = {}^1/_{16}$.

Таблица 2.2. Число различных типов гамет в F_1 и различных генотипов в F_2 при скрещивании особей, гомозиготных по двум различным аллелям определенного числа генов

Число генов	Число типов гамет	Число генотипов	Число фенотипов[1]
1	2	3	2
2	4	9	4
3	8	27	8
4	16	81	16
n	2^n	3^n	2^n

[1] При доминировании: в отсутствие доминирования число различных фенотипов совпадает с числом генотипов.

Множественные аллели

Примеры наследования признаков, которые обсуждались до сих пор в этой главе и основывались на собственных опытах Менделя, касаются двухаллельных генов. Однако многие гены имеют несколько аллелей (множественный аллелизм), хотя каждый конкретный диплоидный организм может быть носителем не более двух аллелей.

Известно большое число примеров множественного аллелизма; с некоторыми из них мы еще будем встречаться в этой книге. Одним из примеров может служить серия аллелей гена кролика, определяющего окраску меха; четыре из них приведены в табл. 2.3. Аллель дикого типа c^+ доминантен по отношению к трем остальным: кролики, гомозиготные по c^+ или гетерозиготные по c^+ и любому другому аллелю, имеют обычную для этих животных серую (агути) окраску (или окраску

Таблица 2.3. Генетическое определение окраски меха у кроликов

Аллель	Генотип	Фенотип
c^+	c^+c^+, c^+c^{ch}, c^+c^h, c^+c^a	Дикий тип
c^{ch}	$c^{ch}c^{ch}$	Шиншилла
	$c^{ch}c^h$, $c^{ch}c^a$	Светло-серый
c^h	c^hc^h, c^hc^a	Гималайский
c^a	c^ac^a	Альбинос

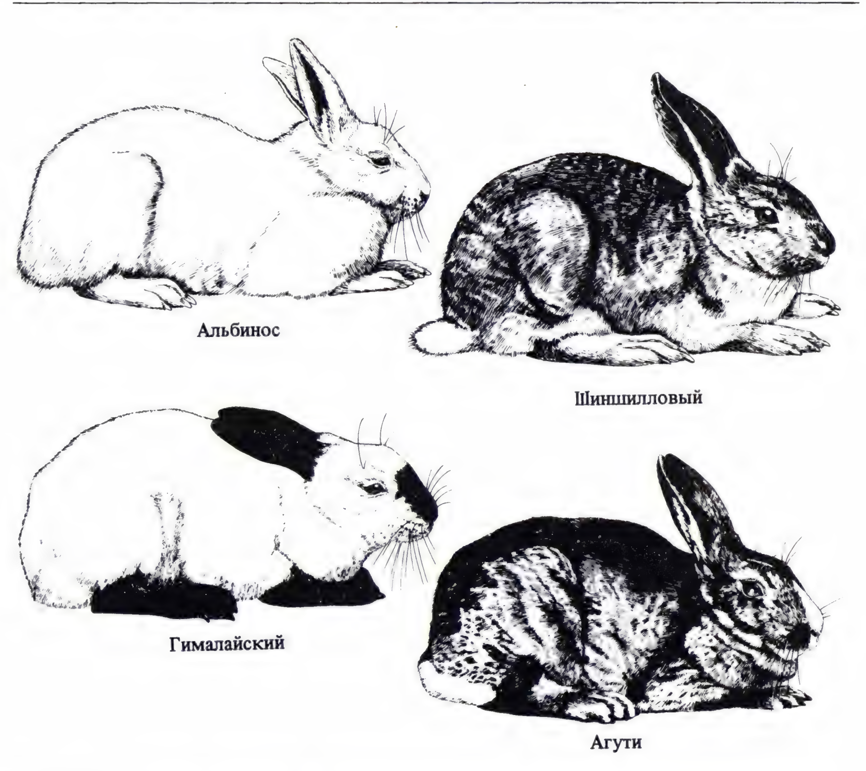


Рис. 2.13. Четыре фенотипа, возникающие при различных комбинациях аллелей гена окраски меха кроликов.

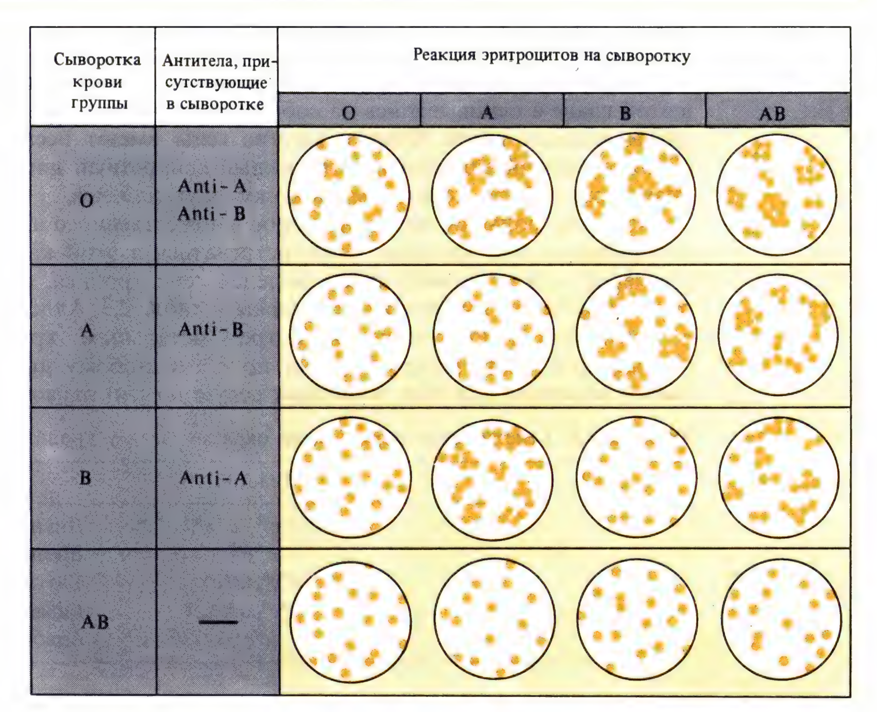


Рис. 2.14. Антигенные реакции, используемые при определении группы крови в системе АВО. В качестве тестера применяются сыворотки крови каждой из четырех групп. Наблюдается реакция, происходящая при смешении капли исследуемой крови с пробным раствором. Например, кровь человека с группой О не агглютинируется ни одним из четырех типов сыворотки, а кровь человека группы А агглютинируется сыворотками групп О и В. На агглютинацию указывает появление хлопьев.

дикого типа). У особей, гомозиготных по аллелю c^{ch}, мех по цвету напоминает мех шиншиллы и несколько светлее дикого типа. У гетерозигот по аллелям c^{ch} и c^{h} или c^{a} мех светло-серый (промежуточный между шиншилловым и белым); аллель c^{ch} проявляет, следовательно, неполное доминирование по отношению к аллелям c^{h} и c^{a}. Гомозиготы $c^{h}c^{h}$ и гетерозиготы $c^{h}c^{a}$ – это кролики так называемого гималайского фенотипа, мех у них белый всюду, кроме лап, хвоста, ушей и кончика носа. Гомозиготы по аллелю c^{a} имеют типично альбиносный фенотип: белый мех и розовые глаза (рис. 2.13).

Другим примером множественного аллелизма может служить система групп крови АВО, открытая Карлом Ландштейнером (1868–1943) в 1900 году. Группы крови важно учитывать при подборе доноров для переливания крови, чтобы избежать слипания эритроцитов донора при их попадании в кровоток реципиента (рис. 2.14).

Существуют четыре группы крови системы АВО: О, А, В и АВ. Они определяются тремя аллелями одного гена: I^{A}, I^{B} и i. Аллели I^{A} и I^{B} доминантны по отношению к аллелю i, но кодоминантны по отношению друг к другу. При наличии трех аллелей возможно шесть генотипов; рецессивность i сводит число групп крови к четырем (табл. 2.4).

Дополнение 2.1. Генетические обозначения

Система генетических обозначений развивалась без твердых заранее установленных правил, и это часто приводило к путанице. Генетики, работавшие с каким-либо определенным видом организмов, мало заботились о том, чтобы применяемые ими обозначения согласовывались с обозначениями, используемыми генетиками, работающими на других объектах. Ниже описываются принципы, которым мы будем следовать в этой книге при обозначении аллелей и генотипов.

Если известны лишь два аллеля какого-то гена, то принято обозначать доминантный аллель курсивной прописной буквой латинского алфавита, а рецессивный – строчной. Например, три возможных диплоидных генотипа для пары аллелей *A* и *a* обозначаются как *AA*, *Aa* и *aa*. Однако в случае нескольких аллелей одного гена или когда известны независимые мутации гена, приводящие к одному мутантному фенотипу, обычно используются другие обозначения. Для обозначения гена или локуса используются курсивные строчные буквы (или группы букв), а аллели обозначаются индексом, помещаемым справа сверху. Например, буква *c* может обозначать ген окраски меха кролика. Нормальный аллель или аллель дикого типа (который часто бывает наиболее доминантным в серии множественных аллелей) обозначается символом c^+, а другие аллели – символами c^{ch}, c^h, c^a и т.д. Часто обозначение c^+ сокращают до знака «+».

При обозначении диплоидных генотипов мы обычно используем косую черту, чтобы показать, что каждый из двух аллелей находится в одной из двух гомологичных хромосом, например c^{ch}/c^+ или $c^{ch}/+$. Удобство такого обозначения более очевидно при рассмотрении нескольких генов, расположенных в разных локусах одной хромосомы (см. гл. 5). Например, рецессивная мутация *scarlet*(*st*) в гомозиготном состоянии (*st*/*st*) определяет ярко-красный (алый) цвет глаз дрозофилы, тогда как доминантный аллель дикого типа st^+ обусловливает темно-красный цвет глаз. Рецессивная мутация *ebony*(*e*) в гомозиготном состоянии (*e*/*e*) определяет темный цвет тела, а соответствующий доминантный аллель дикого типа e^+ – коричневато-желтый. Соответствующие два локуса расположены в одной хромосоме, и возможны два типа двойных гетерозигот, а именно $st^+ e^+/st\ e$ и $st^+\ e/st\ e^+$. В первом случае говорят, что аллели *st* и *e* находятся в *цис*-положении (т.е. расположены в одной из гомологичных хромосом), а во втором случае – в *транс*-положении (расположены в различных гомологичных хромосомах).

Изредка могут происходить доминантные мутации. Сочетания букв, обозначающие такие мутации, часто начинают прописной буквой. Например, мутация *Bar*, определяющая полосковидную форму глаз у дрозофилы, доминантна по отношению к соответствующему аллелю дикого типа, обозначаемому символом B^+.

При обозначении аллелей, определяющих у человека группы крови системы ABO, используется необычная смешанная система обозначений: символы I^A и I^B соответствуют кодоминантным аллелям, а буква *i* обозначает рецессивный аллель, в гомозиготном состоянии определяющий группу крови O.

Описанные выше обозначения применяются как для гаплоидных, так и диплоидных генотипов эукариотических организмов. Обозначения, используемые в генетике бактерий, основаны на других правилах, которые будут изложены в главе 8.

Таблица 2.4. Группы крови системы АВО

Аллель	Генотип	Фенотип (группа крови)
I^A	$I^A I^A$, $I^A i$	A
I^B	$I^B I^B$, $I^B i$	B
	$I^A I^B$	AB
i	ii	O

Таблица 2.5. Число различных генотипов при заданном числе аллелей

Аллели	Генотипы	Гомо-зиготы	Гетеро-зиготы
1	1	1	0
2	3	2	1
3	6	3	3
4	10	4	6
5	15	5	10
n	$n(n+1)/2$	n	$n(n-1)/2$

Количество различных генотипов при множественном аллелизме зависит от числа аллелей. Если аллель один, A, то и генотип один, AA. Если аллеля два, A_1 и A_2, то возможно три генотипа: два типа гомозигот A_1A_1 и A_2A_2 и гетерозиготы A_1A_2. При трех аллелях A_1, A_2 и A_3 возможно шесть генотипов: три типа гомозигот A_1A_1, A_2A_2 и A_3A_3 и три типа гетерозигот A_1A_2, A_1A_3 и A_2A_3. В общем случае при n аллелях возможно $n(n+1)/2$ генотипов, из которых n – гомозиготы, а остальные $n(n-1)/2$ – гетерозиготы (табл. 2.5).

Генотип и фенотип

В 1909 году Вильгельм Иоганнсен сформулировал важное различие между фенотипом и генотипом. Фенотип организма – это совокупность внешних признаков, тех, которые мы можем наблюдать: морфология, физиология и поведение. Генотип – это наследуемая генетическая организация. На протяжении жизни организма его фенотип может изменяться, генотип же остается неизменным.

О различии между фенотипом и генотипом нужно всегда помнить, поскольку соответствие между ними не однозначное. Причина этого состоит в том, что фенотип представляет собой результат сложной сети взаимодействий между различными генами и между генами и окружающей средой.

Вообще говоря, никакие две особи не обладают тождественными фенотипами, хотя и могут быть одинаковыми в отношении одного или нескольких рассматриваемых признаков. Более того, особи, обладающие одинаковыми фенотипами в отношении какого-либо признака, не обязательно одинаковы генотипически. Например, желтые горошины могут быть как у растения, гомозиготного по аллелю «желтизны», так и у гетерозиготы по «желтому» и «зеленому» аллелям.

В природе широко распространено генетическое разнообразие. За исключением однояйцевых (монозиготных) близнецов, развивающихся из одной оплодотворенной яйцеклетки, никакие два размножающихся половым путем организма не могут иметь полностью тождественные генотипы, хотя в отношении отдельных генов их генотипы могут быть идентичными (см. гл. 22). С другой стороны, в результате бесполого размножения данной особи возникают организмы, генетически тождественные друг другу и своему родителю. Однако даже организмы с тождественными генотипами вследствие различий во взаимодействиях с окружающей средой могут обладать различными фенотипами. Напри-

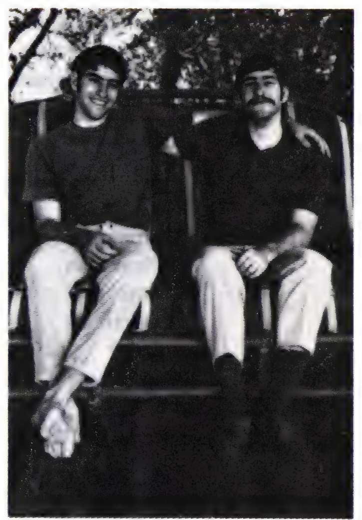




Рис. 2.15. Три пары однояйцевых близнецов несколько различной внешности.

мер, однояйцевые близнецы могут различаться весом, ростом и продолжительностью жизни; эти различия отражают различия в условиях их жизни (рис. 2.15 и табл. 2.6).

Хороший пример влияния внешней среды на фенотип представлен на рис. 2.16. Три растения лапчатки (*Potentilla glandulosa*) были отобраны в Калифорнии, одно на высоте 30 м над уровнем моря, второе – на высоте около 1400 м, а третье – в зоне альпийских лугов в горах Сьерра-Невада на высоте около 3000 м. Каждое растение разрезали на три части, и каждую часть высадили отдельно в одном из трех ботанических садов, расположенных на различной высоте. Растения разделили на части для того, чтобы была уверенность в генетической идентичности растений, выращиваемых в различных условиях.

Сравнение растений в столбцах показывает, что один и тот же генотип в различных условиях определяет различные фенотипы. Эти различия относятся не только к внешним морфологическим признакам, но и к плодовитости, скорости роста и т. п. Сравнение растений в гори-

Таблица 2.6. Конкордантность и дискордантность (в %) некоторых заболеваний у однояйцевых близнецов. (Конкордантность – заболевание обоих близнецов при заболевании одного из них)

Заболевание	Число обследованных пар	Конкордантность	Дискордантность
Корь	189	95	5
Скарлатина	31	64	36
Туберкулез	190	74	26
Некоторые типы опухолей	62	58	42
Диабет	63	84	16
Слабоумие	126	91	9

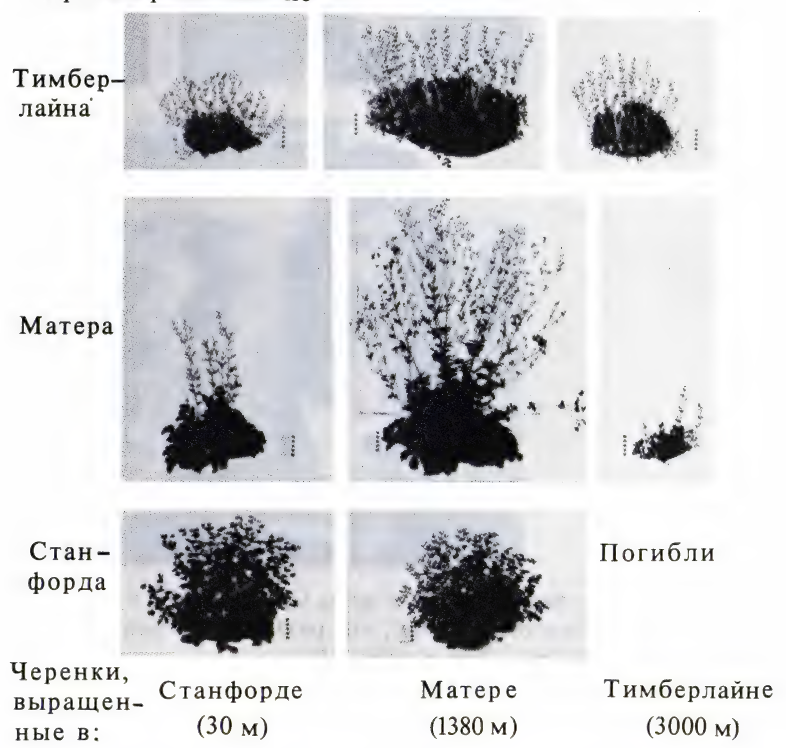


Рис. 2.16. Влияние генотипа и среды на фенотип. Части трех растений *Potentilla grandulosa*, выросших на различной высоте над уровнем моря, культивировали в трех различных ботанических садах. Растения в горизонтальных рядах генетически тождественны, поскольку они выросли из частей одного и того же растения. Растения в вертикальных столбцах генетически различны, но выращивались в одинаковых условиях. Генетически тождественные растения (например, представленные в нижнем ряду) могут процветать или погибать в зависимости от внешних условий. Генетически различные растения (например, представленные в левом столбце) могут обладать совершенно различными фенотипами, несмотря на то что выращиваются они в совершенно одинаковых условиях.

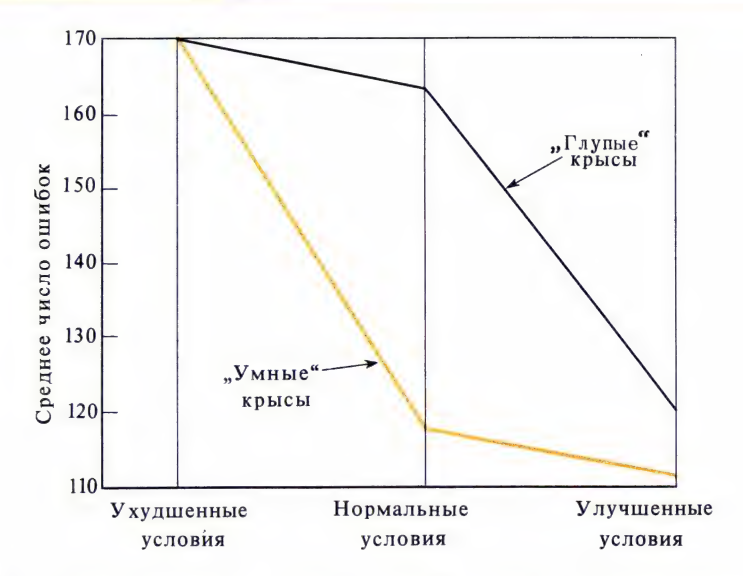


Рис. 2.17. Результаты опыта с двумя линиями крыс. Крысы первой линии отбирались на «сообразительность», вторая линия представлена самыми «глупыми» крысами. Когда крыс обеих линий содержали в тех же условиях, в которых происходил отбор (т. е. в «нормальных» условиях), то «умные» крысы при прохождении лабиринта делали примерно на 45 ошибок меньше, чем их «глупые» сородичи. Однако когда крысы выращивались в неблагоприятных условиях, то представители обеих линий совершали при прохождении лабиринта одинаковое число ошибок. При выращивании крыс в комфортных условиях число ошибок было почти одинаковым.

зонтальных рядах показывает, что при фиксированных внешних условиях генетические различия влекут за собой фенотипические. Из этого опыта следует важный вывод: не существует единственного генотипа, наилучшего при любых условиях. Например, растение, взятое почти с уровня моря, где оно процветало, оказалось неспособным существовать на высоте 3000 м, а растение, взятое с этой высоты, где оно также чувствовало себя прекрасно, вблизи от уровня моря чахло.

Взаимодействие между генотипом и средой иллюстрируется также результатами эксперимента, представленными на рис. 2.17. Были выведены две линии крыс: быстрее всех находившие выход из лабиринта и медленнее всех. В каждом поколении отбирались самые «умные» и самые «глупые» крысы. Потомство каждых составляло следующее поколение, в котором отбор проводился таким же образом. После многих поколений отбора «умные» крысы при прохождении лабиринта совершали лишь около 120 ошибок, тогда как «глупые» – в среднем по 165 ошибок. Однако эти различия ярко проявлялись лишь когда крыс выращивали в обычных условиях. Различия полностью исчезали, если крыс выращивали в крайне неблагоприятных условиях, и почти сглаживались, когда животных содержали, наоборот, в высшей степени комфортных условиях и с точки зрения обеспеченности пищей, и в других отношениях. Как и в случае с растениями лапчатки, мы видим, что, во-первых, данный генотип в различных условиях приводит к формирова-

нию различных фенотипов и, во-вторых, фенотипические различия между двумя генотипами меняются в зависимости от условий: генотип, выгодный в одних условиях, может не оказаться таким в других.

Различные взаимодействия с окружающей средой приводят к тому, что фенотип особи не определяется однозначно его генотипом. Генотип определяет скорее спектр возможных фенотипов; это фенотипическое разнообразие называется *нормой реакции* генотипа. Какой именно фенотип сформируется при данном генотипе, зависит от условий, в которых происходит развитие. По этой причине полная норма реакции любого генотипа всегда остается неизвестной, поскольку определение такой нормы реакции подразумевало бы определение разнообразия фенотипов, которое можно получить из данного генотипа при всех возможных вариантах условий развития, а число таких вариантов фактически бесконечно.

Литература

Clausen J., Keck D. D., Hiesey W. M., 1940. Experimental studies on the nature of species. I. Effects of varied environments on western North American plants, Carnegie Institution of Washington Publ., No. 520, Washington, D.C., pp. 1–452.

Cooper R. M., Zubek J. P. (1958). Effects of enriched and restricted early environments on the learning ability of bright and dull rats, Can. J. Psych., **12,** 159–164.

Dunn L. C., ed., 1951. Genetics in the 20th Century, Macmillan, New York.

Levine L., 1971. Papers on Genetics, Mosby, St. Louis.

Mendel G., Experiments in plant hybridization. English translation of Mendel's classic work. Reprinted, for example, in the following collections by Peters and by Stern and Sherwood.

Peters J. A., ed., 1959. Classic Papers in Genetics, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.

Stern C., Sherwood E. R., eds., 1966. The Origin of Genetics, W. H. Freman, San Francisco.

Sturtevant A. H., Beadle G. W., 1940. An Introduction to Genetics, Saunders, Philadelphia.

Ключевые слова и понятия

Аллель
Анализирующее скрещивание
Ген
Генотип
Гетерозигота
Гомозигота
Дигибридное скрещивание
Дикий тип
Доминантность
Закон независимого комбинирования
Кодоминирование
Множественные аллели
Неполное доминирование
Норма реакции
Пангенез
Поколение F_1
Поколение F_2
Рецессивность
Соматоплазма
Тригибридное скрещивание
Фенотип

Задачи

Замечание: метод хи-квадрат описан в Приложении I: теория вероятности и статистика.

2.1. Мендель установил, что пазушное положение цветов – признак доминантный по отношению к их верхушечному поло-

жению. Обозначим аллель пазушного положения *A*, а верхушечного – *a*. Каковы типы и соотношения гамет и потомства в каждом из следующих скрещиваний: $AA \times aa$, $AA \times Aa$, $Aa \times aa$, $Aa \times Aa$?

2.2. Генетик, работающий с морскими свинками, поставил два скрещивания между черной особью и альбиносом, используя в этих скрещиваниях различных животных. В потомстве первого скрещивания оказалось 12 черных морских свинок, а второго – 6 черных и 5 альбиносов. Каковы возможные генотипы родителей в каждом скрещивании?

2.3. У двух самок морской свинки: альбиноса и гомозиготы по черной окраске – хирургическим путем были пересажены яичники. После скрещивания с самцом-альбиносом у самки-альбиноса родились два черных детеныша. Согласуется ли этот результат с теорией пангенеза? С менделевской теорией наследственности?

2.4. Двух черных самок крысы скрещивали с коричневым самцом. Было получено по нескольку пометов от каждой самки. Потомство первой самки составляли 36 черных особей, потомство второй – 14 черных и 10 коричневых. Каков вероятный механизм наследования черной и коричневой окраски у крыс? Каковы генотипы родителей? Для проверки ваших гипотез используйте метод хи-квадрат.

2.5. Генетик произвел самоопыление у шести зеленых растений определенной линии кукурузы и полученные зерна каждого растения прорастил. В потомстве каждого растения оказались зеленые и альбиносные (лишенные хлорофилла) растения в следующей пропорции:

.Номер родителя	Зеленое потомство	Белое потомство
1	38	11
2	26	11
3	42	12
4	30	9
5	36	14
6	48	12

Каков вероятный механизм наследования альбинизма у кукурузы? Каковы генотипы родительских растений? Используйте метод хи-квадрат, проверяя вашу гипотезу применительно к каждому родительскому растению.

2.6. Растения кукурузы той же линии, что и в условиях предыдущей задачи, опыляли пыльцой растений другой линии. Из полученных семян выросли 20 зеленых и 10 белых растений. Какому расщеплению соответствует этот результат, 3 : 1 или 1 : 1? Каков вероятный генотип отцовского растения?

2.7. У кур розовидный гребень – признак, доминантный по отношению к простому гребню. Фермер полагает, что некоторые из его кур-виандотов с розовидным гребнем являются носителями аллеля простого гребня. Как он может установить, какие из кур гетерозиготны?

2.8. Существует заболевание, при котором в возрасте между 10 и 20 годами начинается постепенная атрофия дистальных отделов мышц ног. Изучение родословных показывает, что во всех случаях той же болезнью страдал один из родителей больного. Каков вероятный механизм наследования этого заболевания?

2.9. Существует еще более тяжелая форма того же заболевания. Эта форма обнаруживается почти исключительно у детей, родители которых являлись двоюродными братом и сестрой и сами не страдали от этого заболевания. Как наследуется этот тип мышечной атрофии?

2.10. Мужчина с группой крови A женился на женщине с группой крови B, и у них родился ребенок с группой крови O. Каковы генотипы всех трех? Какие еще генотипы и с какими частотами можно ожидать в потомстве от таких браков?

2.11. В таблице 2.1 представлено число потомков различного типа, полученных в каждом из семи проводившихся Менделем опытов в поколении F_2. Используя метод хи-квадрат, проверьте в каждом случае, соответствуют ли приведенные числа гипотезе о расщеплении в отношении 3 : 1.

2.12. У морских свинок аллель черной окраски *B* доминантен по отношению к аллелю альбинизма *b*, а аллель грубошерстности *R* доминантен по отношению к аллелю гладкошерстности *r*. Гены *R* и

B независимы. Каковы будут результаты скрещивания между гомозиготой по генам черной окраски и грубошерстности с гладкошерстным животным-альбиносом в F_1? В F_2? А скрещивания между F_1 и гладкошерстным родителем-альбиносом?

2.13. Черную грубошерстную морскую свинку скрещивали с грубошерстным альбиносом (см. условие предыдущей задачи). В потомстве оказалось 13 черных грубошерстных, 16 грубошерстных альбиносов, 6 черных гладкошерстных и 5 гладкошерстных альбиносов. Определите генотипы родителей и проверьте вашу гипотезу, используя метод хи-квадрат.

2.14. У *Drosophila melanogaster* существует рецессивный аллель, приводящий к развитию коротких рудиментарных крыльев *vg*; соответствующий доминантный аллель (vg^+) обусловливает формирование нормальных крыльев. В другом генном локусе существует рецессивный аллель *st*, вызывающий алый цвет глаз; соответствующий доминантный аллель (st^+) отвечает нормальному красному цвету. Полученное в трех различных опытах потомство описано ниже. Определите генотипы родителей, используя для проверки гипотез метод хи-квадрат.

Фенотип родителей	Фенотип потомства			
	Длинные крылья, красные глаза	Длинные крылья, алые глаза	Короткие крылья, красные глаза	Короткие крылья, алые глаза
1. Длинные крылья, красные глаза × короткие крылья, алые глаза	178	164	142	140
2. Длинные крылья красные глаза × длинные крылья, красные глаза	364	0	107	0
3. Длинные крылья, красные глаза × длинные крылья красные глаза	309	107	95	29

2.15. У кунжута одинарный плод – признак, доминантный по отношению к тройному, а нормальный (гладкий) лист – признак, доминантный по отношению к морщинистому листу. Оба признака наследуются независимо. Каковы генотипы родителей в каждом из пяти перечисленных ниже опытов?

Фенотип родителей	Фенотип потомства			
	Одинарный, нормальный	Одинарный, морщинистый	Тройной, нормальный	Тройной, морщинистый
Одинарный, нормальный × × тройной, нормальный	362	118	0	0
Одинарный, нормальный × × тройной, морщинистый	211	0	205	0
Одинарный, морщинистый × × тройной, нормальный	78	90	84	88
Одинарный, нормальный × × тройной, нормальный	318	98	323	104
Одинарный, нормальный × × одинарный, морщинистый	110	113	33	38

2.16. Каково число различных типов гамет, генотипов и фенотипов в потомстве самоопыляющегося растения, гетерозиготного по трем, пяти и семи различным доминантным генам?

2.17. Растение, гетерозиготное по четырем независимо наследуемым парам генов (*AaBbCcDd*), самоопыляется. Определите ожидаемые частоты следующих генотипов в потомстве этого растения: 1) *aabbccdd*, 2) *aabbccDd*, 3) *AaBbCcDd*.

2.18. У одного из видов дрозофилы известно семь аллелей гена, кодирующего фермент фосфатазу. Каково число различных генотипов по этому гену?

2.19. Какую долю всех возможных генотипов составляют гомозиготы, когда число различных аллелей данного гена равно трем? Пяти? Семи?

2.20. Скрещивали крыс дикого фенотипа (агути, гладкие, темноглазые, с неослабленной окраской) с черными, пятнистыми, красноглазыми крысами, имеющими ослабленную окраску. В поколении F_1 все крысы имели окраску дикого типа. Их скрещивали с черными, пятнистыми, рубиновоглазыми крысами, окраска которых ослаблена. Было получено следующее потомство (если признак не обозначен, это означает, что он относится к дикому типу):

Окраска дикого типа	41
Черные	50
Агути, пятнистые	29
Рубиновоглазые, черные	38
Агути ослабленная	36
Черная ослабленная	29
Пятнистые, агути ослабленная	33
Пятнистые, черная ослабленная	34
Рубиновоглазые, агути ослабленная	39
Рубиновоглазые, черная ослабленная	34
Пятнистые, рубиновоглазые, агути	35
Пятнистые, рубиновоглазые, черные	32
Пятнистые, рубиновоглазые, агути ослабленная	25
Пятнистые, красноглазые, черная ослабленная	30

Объясните результаты. В каких пропорциях будут представлены эти фенотипы в потомстве от скрещивания $F_1 \times F_1$?

3

Хромосомные основы наследственности

Гены и хромосомы

Всякий раз, когда выясняется, что две, казалось бы, разные области науки на самом деле взаимосвязаны, факты, накопленные в каждой из них, можно использовать для объяснения явлений, изучаемых в другой области. Такой подход, как правило, приносит успех. Именно это и произошло, когда было показано, что менделевская генетика и процессы митоза и мейоза связаны между собой. В 1902 г. два исследователя – Вальтер Саттон в США и Теодор Бовери в Германии – независимо друг от друга предположили, что гены расположены в хромосомах, и эта идея положила начало *хромосомной теории наследственности*. Аргументом в пользу такого предположения был параллелизм в поведении в процессах мейоза и оплодотворения хромосом, с одной стороны, и генов – с другой. Существование двух аллелей данного признака, один из которых наследуется от одного родителя, а другой – от второго, соответствует существованию двух хромосом, каждая из которых приходит от одного из родителей. Два аллеля каждого признака расходятся при формировании гамет, поскольку гомологичные хромосомы каждой пары попадают в процессе мейоза в разные гаметы (рис. 3.1). Некоторые гены, определяющие различные признаки, наследуются и комбинируются независимо, поскольку они расположены в негомологичных хромосомах, а эти хромосомы комбинируются в гаметах независимо от того, от какого из родителей они были получены (рис. 3.2).

Параллелизм в поведении генов и хромосом в процессе образования гамет и оплодотворении убедительно свидетельствовал в пользу предположения, что гены расположены в хромосомах. Еще более неотразимым доказательством справедливости хромосомной теории наследственности стало обнаружение взаимосвязи между конкретными генами

Рис. 3.1. Хромосомная основа закона расщепления Менделя. Пример иллюстрирует скрещивание растений с гладкими и морщинистыми семенами. Изображены только две пары хромосом, в одной из этих пар находится ген, ответственный за форму семян. У растений с гладкими семенами мейоз приводит к образованию гамет с аллелем гладкости (*R*), а у растений с морщинистыми семенами – гамет с аллелем морщинистости (*r*). Гибриды первого поколения F_1 имеют одну хромосому с аллелем гладкости и одну – с аллелем морщинистости. Мейоз в F_1 приводит к образованию в равном числе гамет с *R* и с *r*. Случайное попарное объединение этих гамет при оплодотворении приводит в поколении F_2 к появлению особей с гладкими и морщинистыми горошинами в отношении 3 : 1.

Круглые семена

Морщинистые семена

Поколение P

R

R

×

r

r

Гаметы

R

r

Поколение F_1

R

r

МЕЙОЗ

Метафаза I

R

r

Метафаза II

R

r

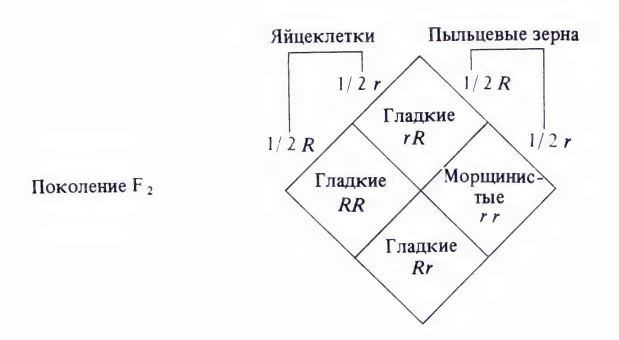
Гаметы: 1/2 *R*, 1/2 *r*

R

R

r

r



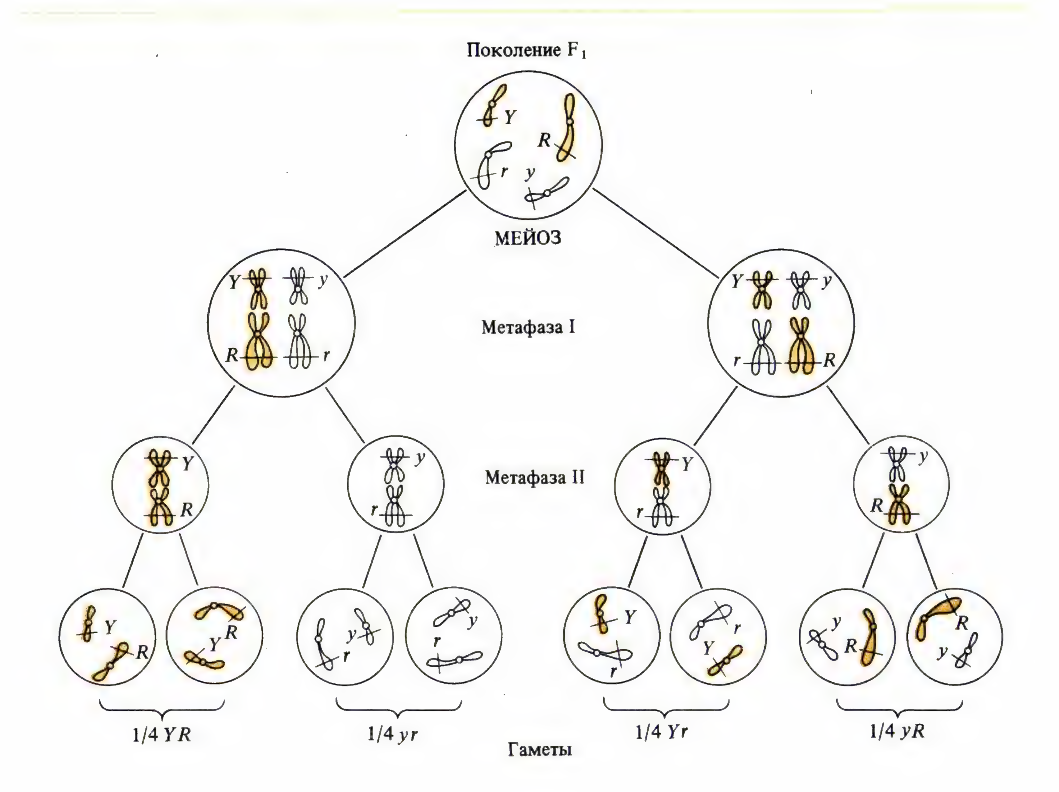


Рис. 3.2. Закон независимого комбинирования как следствие независимого расхождения негомологичных хромосом в мейозе. Скрещивание растений, отличающихся по форме и цвету семян (гладкие желтые × зеленые морщинистые), дает гибридные растения, у которых в хромосомах одной гомологичной пары содержатся аллели *R* и *r*, а другой гомологичной пары – аллели *Y* и *y*. В метафазе I мейоза хромосомы, полученные от каждого из родителей, могут с равной вероятностью отходить либо к одному и тому же полюсу веретена (левый рисунок), либо к разным (правый рисунок). В первом случае возникают гаметы, содержащие те же комбинации генов (*YR* и *yr*), что и у родителей, во втором случае – альтернативные сочетания генов (*Yr* и *yR*). В результате с вероятностью 1/4 образуются четыре типа гамет, случайная комбинация этих типов приводит к расщеплению потомства 9 : 3 : 3 : 1, как это и наблюдалось Менделем.

и конкретными хромосомами. Существование такой связи было впервые продемонстрировано в опытах, поставленных Нобелевским лауреатом Томасом Хантом Морганом в 1910 году и его студентом и сотрудником Кальвином Бриджесом в 1916 году. Эти эксперименты были проделаны на *Drosophila melanogaster* – маленькой желтовато-коричневой плодовой мушке, скопления которой можно видеть летом и ранней осенью вокруг опавших и прелых фруктов (рис. 3.3 и 3.4).

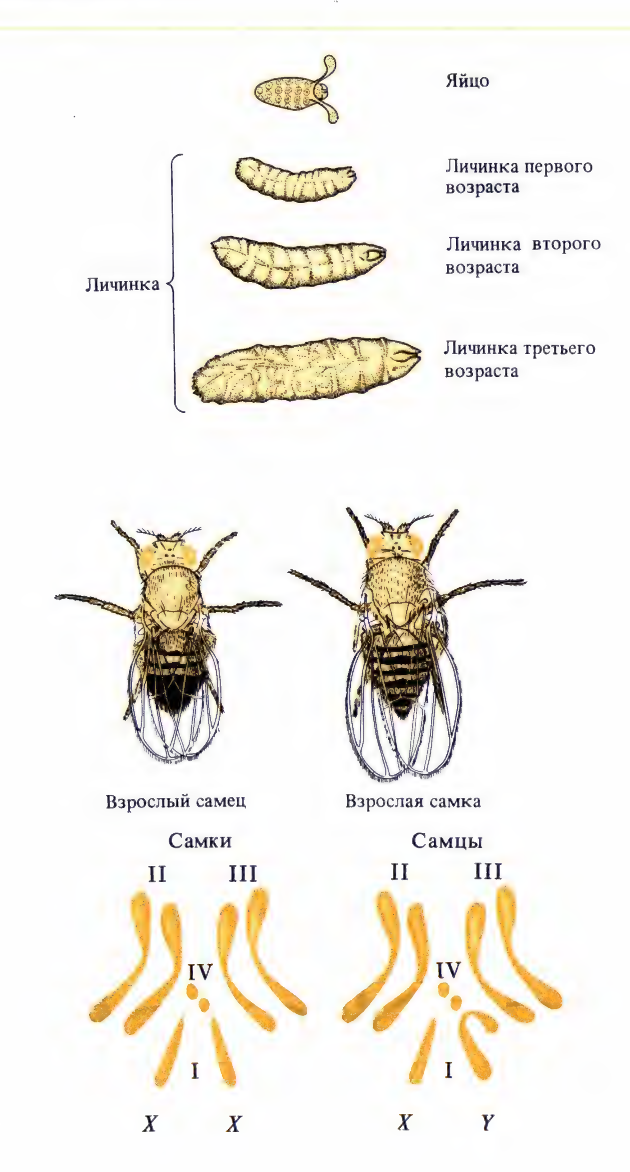


Рис. 3.3. Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* размножается, питаясь опавшими фруктами и продуктами бродильных производств. Это мелкое насекомое длиной около двух миллиметров и весом около одного миллиграмма с желтовато-коричневым телом и красными глазами. Дрозофила – очень распространенный и удобный объект генетических исследований, поскольку время генерации у этих мух очень мало (около двух недель), а численность потомства велика (несколько сотен от каждого скрещивания). Дрозофилы легко разводятся в лабораторных условиях.

Рис. 3.4. Хромосомы *Drosophila melanogaster*. Хромосомы первой пары имеют одинаковую морфологию у самок и разную – у самцов: X-хромосомы – телоцентрические, Y-хромосома – акроцентрическая; вторая и третья хромосомы – метацентрики; четвертая хромосома очень мала.

Наследование, сцепленное с полом

Как и многие другие великие научные свершения, открытия Моргана и Бриджеса были сделаны в процессе анализа отклонений от ожидаемых результатов. Морган использовал для своих опытов линию *D.*

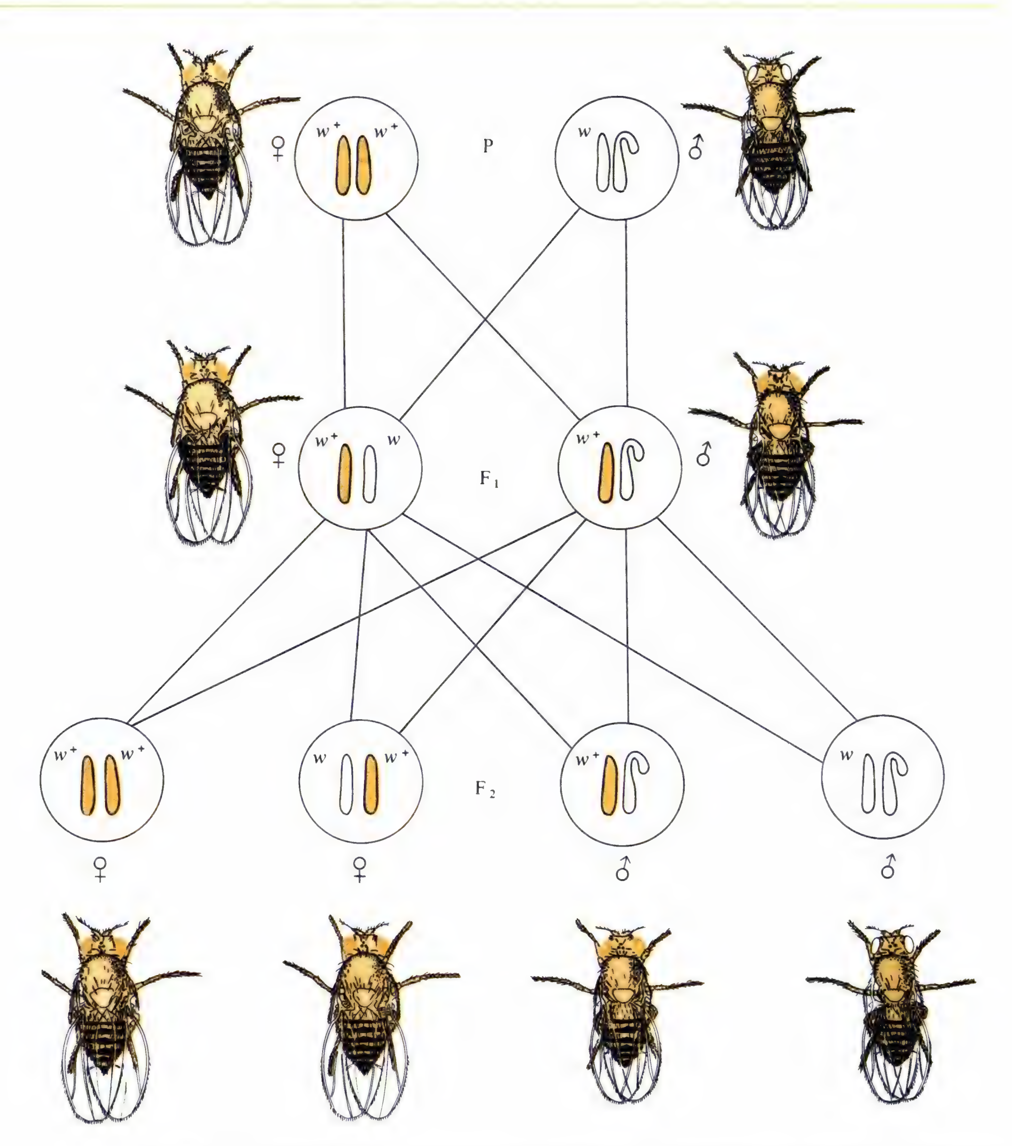


Рис. 3.5. Сцепленное с полом наследование у *Drosophila melanogaster*. Скрещиваются красноглазая самка и белоглазый самец; символы w^+ и w обозначают аллели красноглазости и белоглазости соответственно.

melanogaster с белыми, а не с обычными красными глазами. Линия разводилась в чистоте: потомство белоглазых мух также было белоглазым. Однако, когда белоглазых мух скрещивали с красноглазыми, соотношение тех и других в потомстве не согласовывалось с менделевскими законами наследования.

Если красноглазыми были самки, а белоглазыми самцы (рис. 3.5), то в F_1 все мухи имели красные глаза, что соответствует гипотезе о доминантности этого признака. При скрещивании между собой мух из F_1,

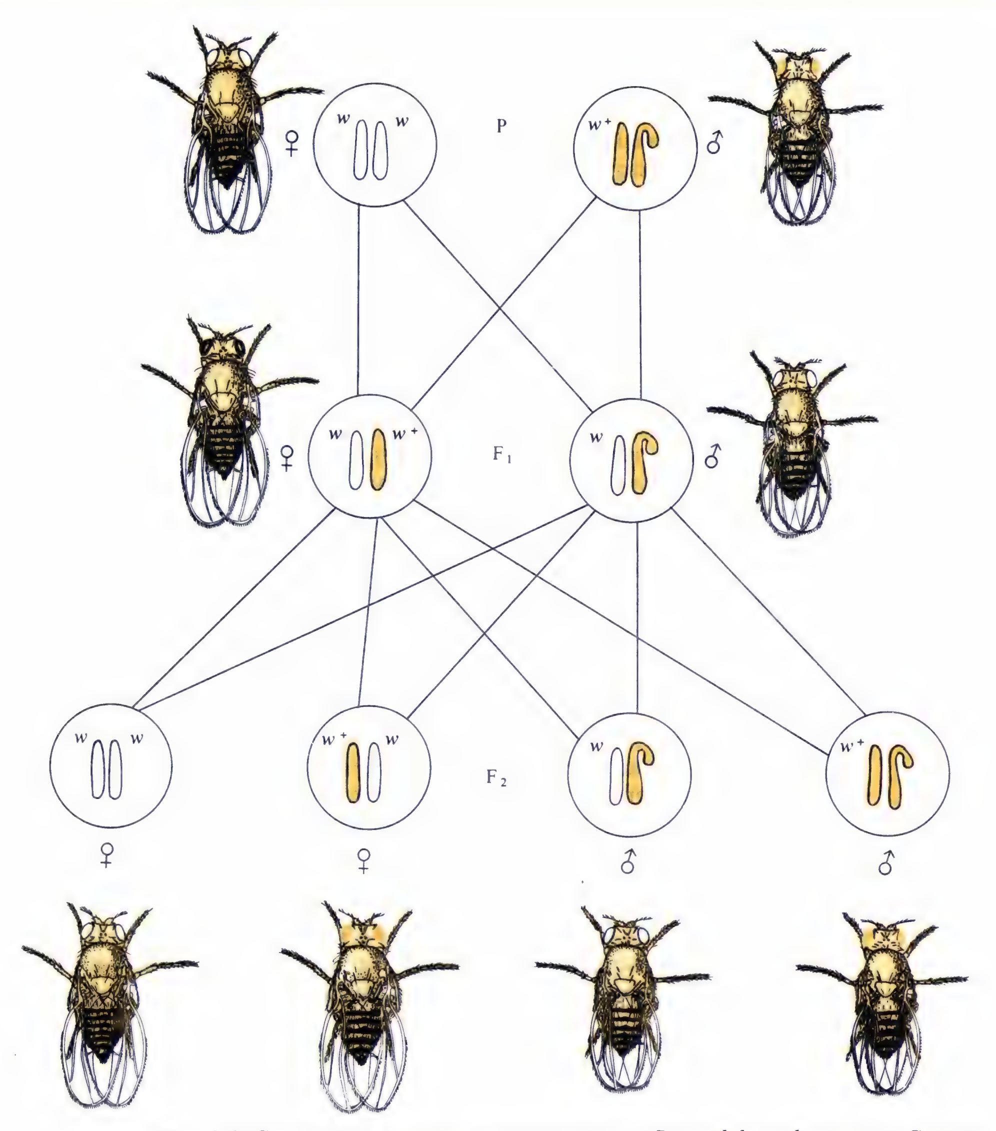


Рис. 3.6. Сцепленное с полом наследование у *Drosophila melanogaster*. Скрещиваются белоглазая самка и красноглазый самец. Результаты этого скрещивания отличны от результатов реципрокного скрещивания, представленных на рис. 3.5.

три четверти потомства в F_2 было красноглазым, а одна четверть – белоглазой, т.е. и в этом случае результаты, казалось бы, подтверждают предположение о доминантности признака «красные глаза». Важно, однако, что в F_2 *все самки были красноглазыми, тогда как среди самцов половина имела красные глаза, а половина – белые*. Это не совпадало с предсказаниями, следующими из менделевских законов наследственности. Неожиданными оказались и результаты скрещивания между собой мух из F_2. Все самцы разводились в чистоте: красноглазые самцы были но-

сителями лишь генов красноглазости, белоглазые – лишь генов белоглазости. Самки из F_2 были двух типов: потомство одних было исключительно красноглазым, тогда как в потомстве других половина самцов имела красные глаза, а половина – белые.

При скрещивании белоглазых самок с красноглазыми самцами результаты были другими (рис. 3.6). Не все потомство от такого скрещивания в F_1 было красноглазым, как следовало бы ожидать на основе законов Менделя, исходя из доминирования признака «красные глаза». Напротив, лишь половину потомства составляли мухи с такими глазами, тогда как вторая половина имела белые глаза; кроме того, все красноглазые мухи были самками, а белоглазые – самцами. При их скрещивании между собой в F_2 потомство состояло наполовину (а не на четверть!) из белоглазых мух и наполовину из красноглазых, причем в равном числе у обоих полов.

Морган показал, что все эти результаты можно объяснить, если предположить, что, во-первых, ген, определяющий цвет глаз, расположен в половой хромосоме (X-хромосоме) и, во-вторых, что половая хромосома самцов (Y-хромосома) не содержит этот ген. Как отмечалось в гл. 1, хромосомы образуют пары. Однако хромосомы одной из пар у самок и самцов различны; эти хромосомы связаны с генетическим определением пола. Клетки самок дрозофилы содержат по две X-хромосомы, а клетки самцов – две разные хромосомы, X и Y (рис. 3.4). Самки получают по одной X-хромосоме от отца и от матери и передают свои X-хромосомы как дочерям, так и сыновьям. Самцы же получают X-хромосому от матери и передают ее лишь дочерям (рис. 3.5 и 3.6). Соответственно признаки, определяемые генами, расположенными в X-хромосоме, наследуются «крест-накрест»: самцы передают эти признаки внукам лишь через дочерей, но не через сыновей.

Морган пришел к заключению, что белый цвет глаз у дрозофилы – это *признак, сцепленный с полом*; другими словами, ген, определяющий этот признак, расположен в X-хромосоме. Обнаруженное в этих опытах соответствие между поведением конкретного гена и конкретной хромосомы, хорошо видной на микроскопических препаратах, послужило веским доказательством справедливости хромосомной теории наследственности. Окончательно эта теория была доказана Бриджесом шесть лет спустя.

Нерасхождение X-хромосом

Как показал Морган, при скрещивании белоглазых самок дрозофилы с красноглазыми самцами дочери оказываются красноглазыми, а сыновья – белоглазыми (рис. 3.6). Однако и из этого правила бывают, оказывается, редкие исключения. Примерно у одной из двух тысяч мух в F_1 от такого скрещивания цвет глаз оказывается противоположным: белым у самок и красным у самцов. Бриджес предположил, что появление редких мух возможно при *нерасхождении* X-хромосом; другими словами, в тех случаях, когда X-хромосомы не расходятся в мейозе к разным полюсам, а направляются вместе к одному из полюсов, в результате чего образуются яйцеклетки с двумя X-хромосомами и яйцеклетки без X-хромосом (рис. 3.7).

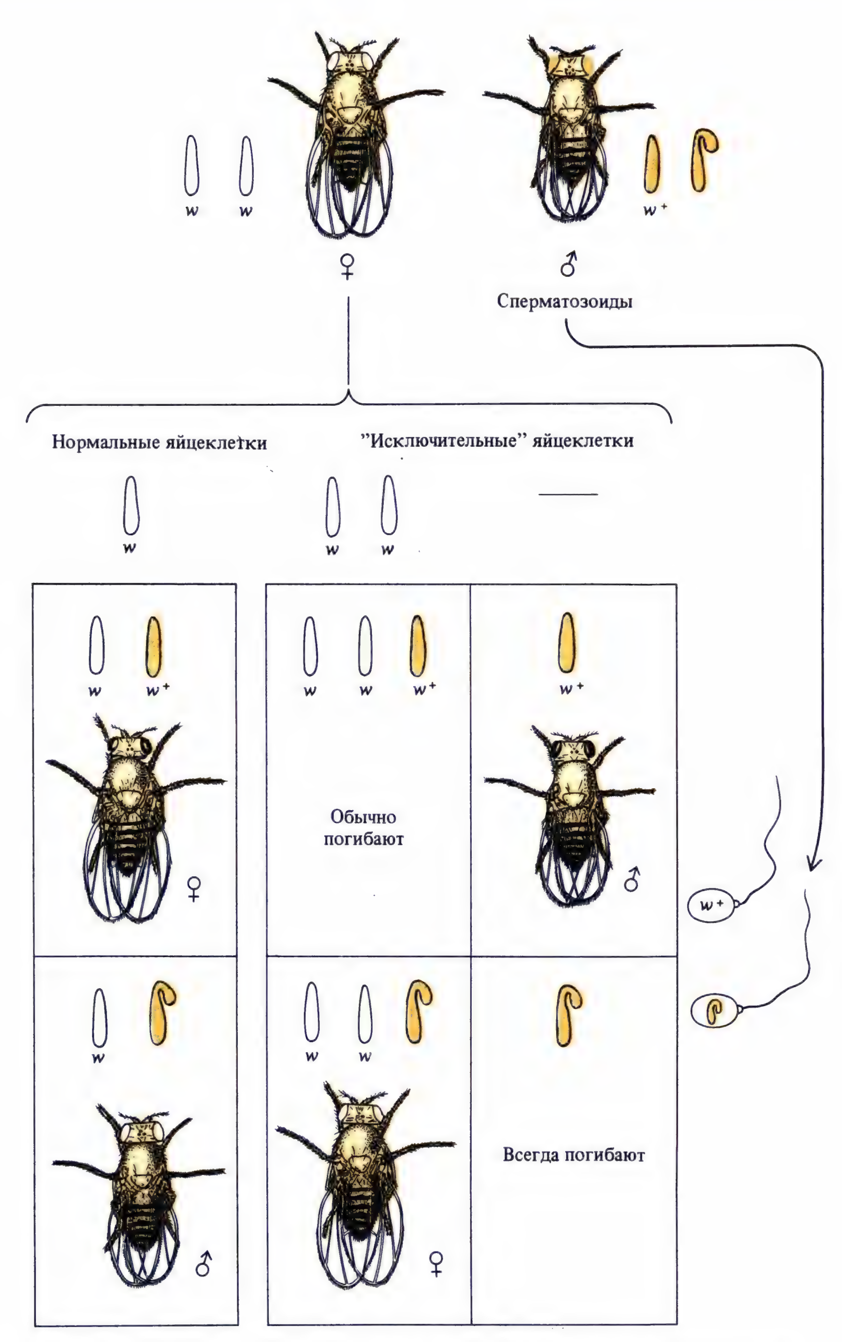


Рис. 3.7. Первичное нерасхождение X-хромосом у *Drosophila melanogaster*. В левой части рисунка для сравнения изображены результаты правильного расхождения.

Если у белоглазой мухи образуется яйцеклетка с двумя X-хромосомами и эта яйцеклетка оплодотворяется спермием, содержащим Y-хромосому, то образовавшаяся зигота имеет две X-хромосомы и одну Y-хромосому, причем обе X-хромосомы содержат ген белых глаз. Бриджес предположил, что белоглазые самки в потомстве от скрещивания между красноглазыми самцами и белоглазыми самками развиваются именно из таких зигот. Когда же яйцеклетка, не содержащая ни одной X-хромосомы, оплодотворяется спермием красноглазого самца, несущим X-хромосому, то в зиготе оказывается одна X-хромосома, несущая ген красных глаз, а Y-хромосомы нет вовсе. Бриджес предположил, что из таких зигот развиваются красноглазые самцы. Другими словами, гипотеза Бриджеса состояла в том, что появляющиеся с частотой 1 : 2000 белоглазые самки получают по две X-хромосомы от матери (и Y-хромосому от отца), а такие же редкие красноглазые самцы получают лишь одну отцовскую X-хромосому (и, следовательно, вовсе лишены Y-хромосомы).

Гипотеза Бриджеса была умозрительной, но допускала экспериментальную проверку путем изучения хромосомных наборов мух, представляющих собой исключение из общего правила. Прямые наблюдения показали, что в клетках «исключительных» белоглазых самок действительно содержится по две X-хромосомы и по одной Y-хромосоме, а клетки «исключительных» красноглазых самцов имеют по одной X-хромосоме, тогда как Y-хромосома у них отсутствует вовсе. Таким образом, было показано, что конкретный ген вне всяких разумных сомнений локализован в конкретной хромосоме.

Вторичное нерасхождение

Самцы дрозофилы, лишенные Y-хромосомы, внешне нормальны, но стерильны. Самки с двумя X-хромосомами и одной Y-хромосомой нормальны и плодовиты. Бриджес скрещивал таких самок (XXY) с нормальными красноглазыми самцами (XY). Он обнаружил, что около 4% самок в потомстве от таких скрещиваний имеют белые глаза, а около 4% самцов – красные глаза; остальные 96% потомства составляли красноглазые самки и белоглазые самцы. Бриджес предположил, что эти 4% составляют самки и самцы, возникающие снова в результате нерасхождения X-хромосом в мейозе у самок. Он назвал такое нерасхождение *вторичным*, поскольку оно происходит в потомстве самок, появившихся в результате *первичного* нерасхождения X-хромосом (и потому обладающих двумя X-хромосомами и одной Y-хромосомой) (рис. 3.8). Вторичное нерасхождение происходит с частотой около 1 : 25, т. е. примерно в 100 раз чаще, чем первичное нерасхождение (1 : 2000).

Нерасхождение может быть следствием физического сцепления X-хромосом, в таком случае нерасхождение имеет место в 100% случаев (это явление было открыто в 1922 году Лилиан Морган, женой Томаса Моргана) (рис. 3.9). Желтый цвет тела у *Drosophila melanogaster* определяется сцепленным с полом аллелем *yellow* (*y*), рецессивным по отношению к аллелю дикого типа (y^+). Цвет тела у дрозофил, гомозиготных по этому аллелю, много светлее нормального. Морган обнаружила существование желтых самок, которые при скрещивании с нормальными самцами давали в потомстве лишь желтых дочерей и нормальных сы-

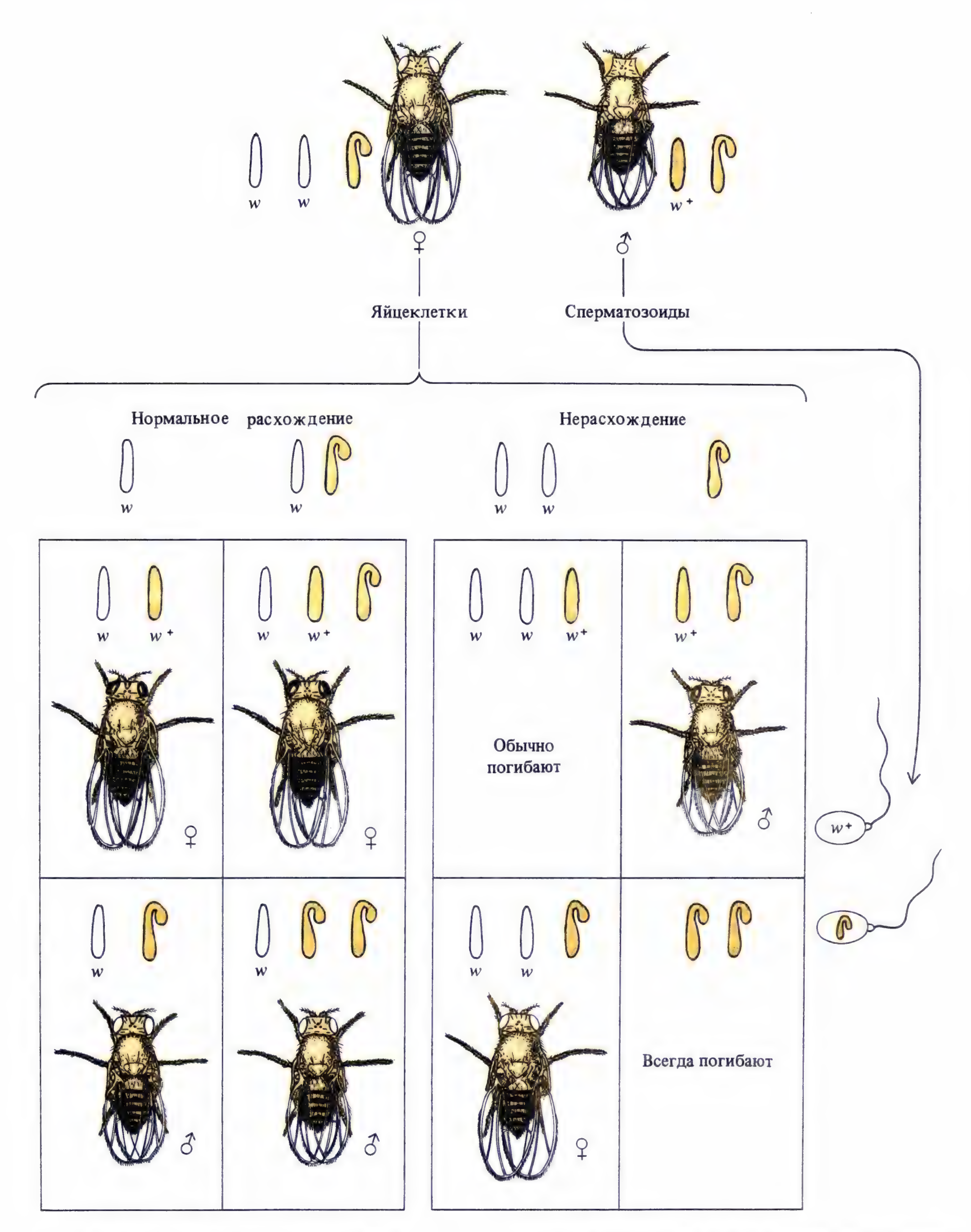


Рис. 3.8. Вторичное нерасхождение X-хромосом *Drosophila melanogaster*. Бриджес предположил, что мейоз у самок с двумя X-хромосомами и одной Y-хромосомой происходит двояко: в первом случае X-хромосомы расходятся к разным полюсам и к одному из них отходит также Y-хромосома (92%), во втором случае обе X-хромосомы отходят к одному полюсу, а Y-хромосома – к другому; это происходит в 8% случаев, но только половина зигот, образовавшихся при участии таких гамет, способна к нормальному развитию, так что число соответствующих «исключительных» мух составляет около 4%. Свою гипотезу Бриджес подтвердил прямыми наблюдениями хромосомных препаратов различных типов мух.

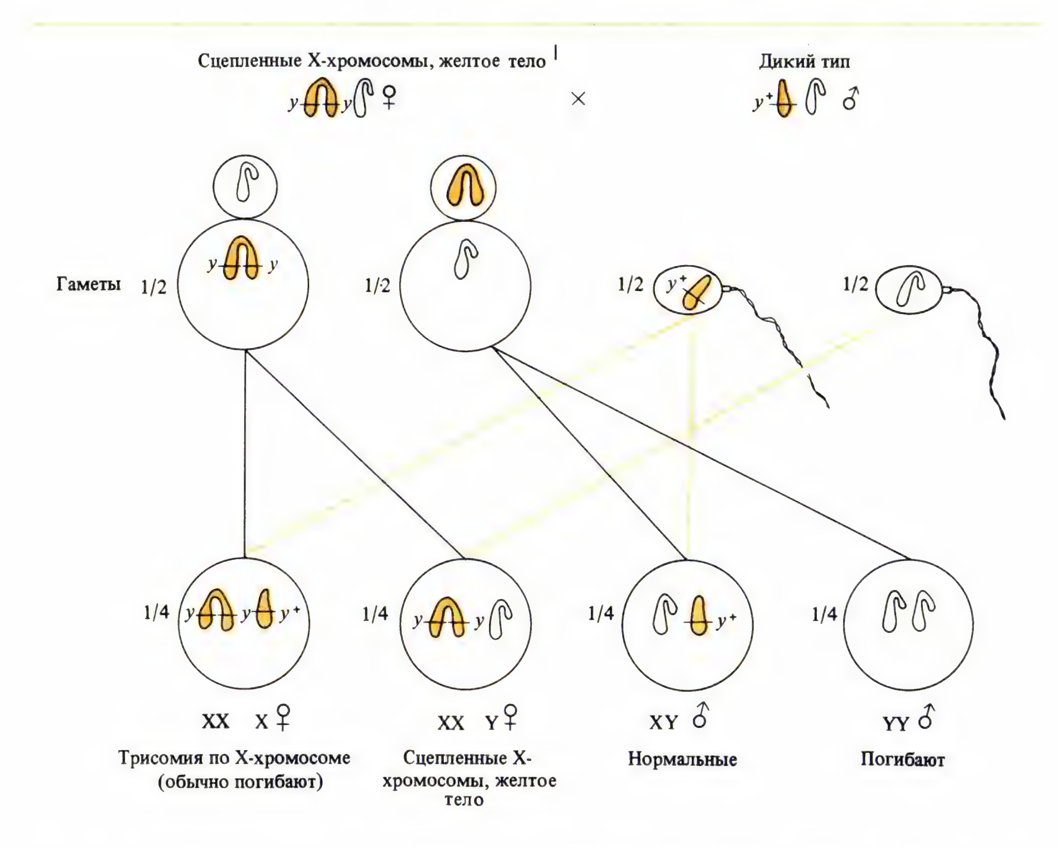


Рис. 3.9. Нерасхождение X-хромосом вследствие их сцепленности. X-хромосомы изображены цветными, Y-хромосомы – белыми. У желтых самок с такой двойной X-хромосомой яйцеклетки бывают только двух типов, поскольку сцепление X-хромосом сохраняется во время мейоза, и в результате они вместе отходят к одному из полюсов. При оплодотворении спермиями с X-хромосомой эти яйцеклетки дают зиготы с тремя X-хромосомами, которые обычно погибают, и зиготы с одной X- и одной Y-хромосомой, как у обычных самцов. Когда те же два типа яйцеклеток оплодотворяются спермиями с Y-хромосомой, то возникают зиготы с двумя сцепленными X-хромосомами и одной Y-хромосомой и нежизнеспособные зиготы с двумя Y-хромосомами и не имеющие ни одной X-хромосомы.

новей, а не нормальных дочерей и желтых сыновей, как подавляющее большинство. Желтые самки сохраняли эту особенность своих матерей: их потомство также составляли лишь желтые дочери и нормальные сыновья. Цитологический анализ показал, что клетки таких самок содержат по две X-хромосомы, соединенных одной центромерой, и по одной Y-хромосоме.

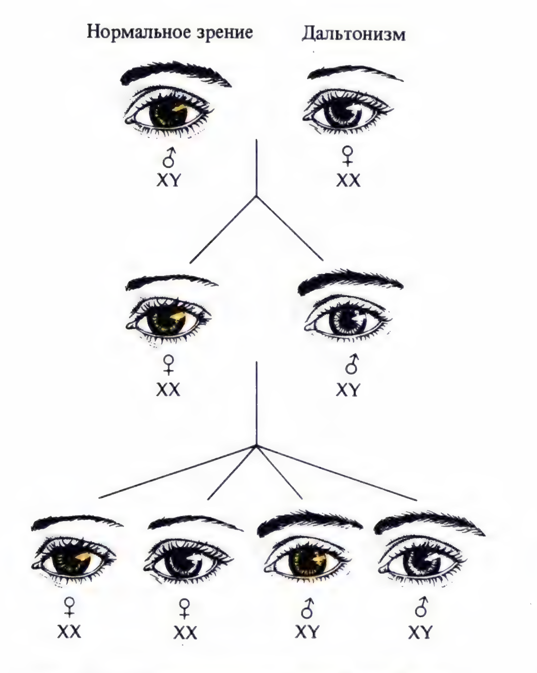
Нерасхождение хромосом встречается не только у дрозофил, но и у других видов. У человека, например (см. гл. 21), нерасхождение в мейозе хромосом двадцать первой пары приводит к рождению детей, клетки которых содержат по три 21-х хромосомы. Это влечет за собой различные отклонения от нормального развития, называемые синдромом Дауна. Нерасхождение половых хромосом у человека приводит к нару-

шениям развития, называемым синдромом Клайнфельтера. Клетки таких людей содержат по две X-хромосомы и по одной Y-хромосоме. Нерасхождения хромосом случаются также и в митозе.

Сцепленное с полом наследование у человека и других видов

Механизм сцепленного с полом наследования, описанный выше для дрозофилы, характерен также для всех животных и растений, у которых мужской пол является гетерогаметным. Самцы называются *гемизиготными* по генам, расположенным в X-хромосоме, поскольку в отношении этих генов они не являются ни гомо-, ни гетерозиготными. У человека известно около 150 признаков, сцепленных с полом. Характер наследования одной из форм дальтонизма – от матери к ее сыновьям – известен уже сотни лет. В 1911 году Эдмунд Вильсон указал на то, что все известные факты наследования дальтонизма можно объяснить, предположив, что дальтонизм определяется рецессивным сцепленным с полом аллелем, а мужской пол у людей гетерогаметен (рис. 3.10).

Другим примером сцепленного с полом признака у человека может служить гемофилия – тяжелое заболевание, для которого характерна неспособность крови свертываться. У нормальных людей при небольшом



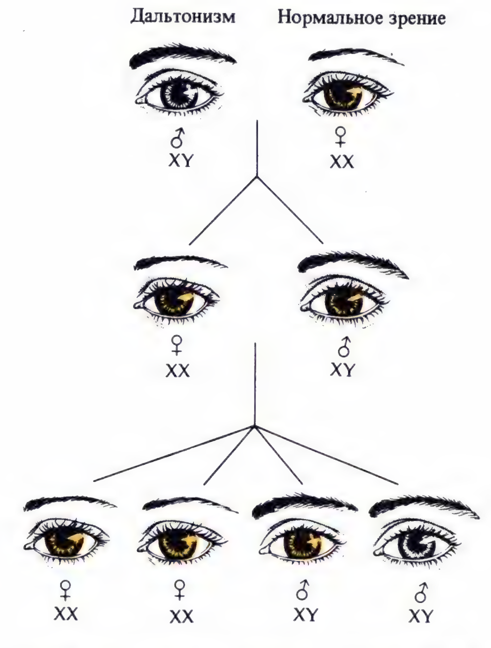


Рис. 3.10. Наследование одной из форм дальтонизма у людей. Все сыновья женщины-дальтоника – дальтоники, все ее дочери – носители (гетерозиготы) гена дальтонизма. Мужчина-дальтоник передает ген дальтонизма всем своим дочерям, и через них он наследуется половиной сыновей. (Цвет глаз при этом, конечно, не играет роли; на рисунке неокрашенность радужной оболочки означает дальтонизм.)

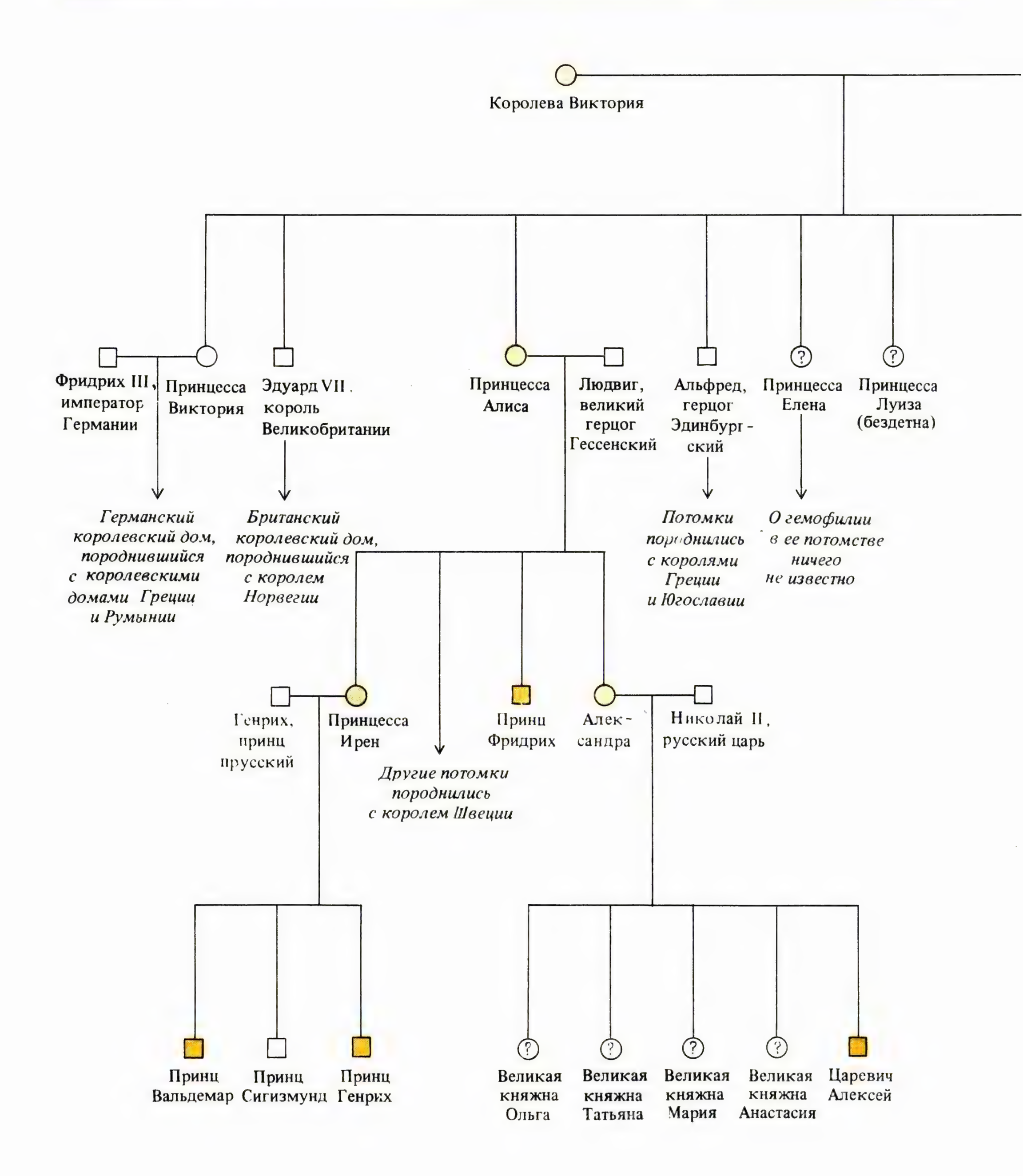
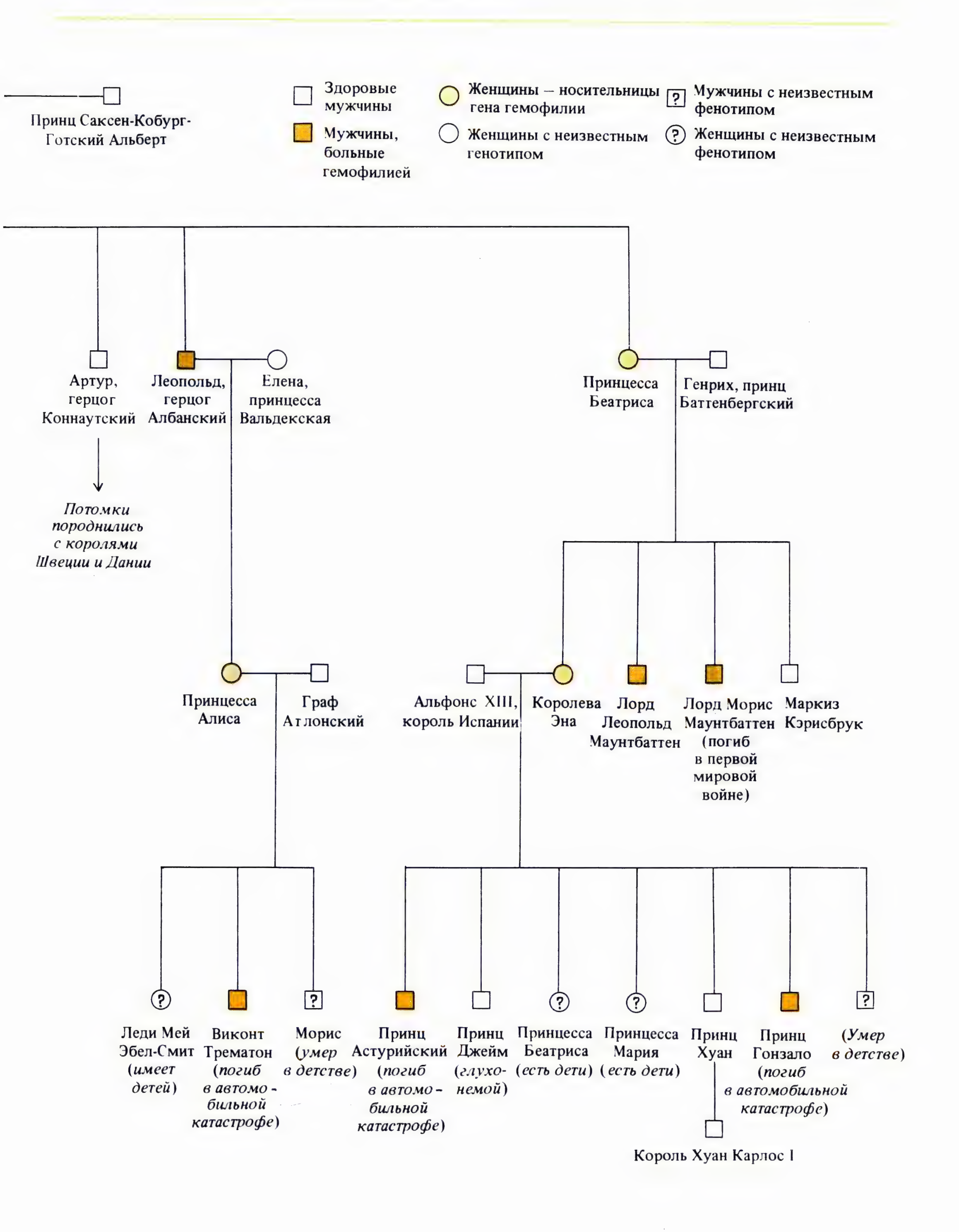


Рис. 3.11. Наследование гемофилии в потомстве королевы Виктории. Как это принято при построении родословных у человека, женщины изображены кружками, мужчины – квадратиками. Горизонтальные линии между квадратом и кружком означают супружество, вертикальные линии проведены к потомству.



Принц Саксен-Кобург-Готский Альберт
Здоровые мужчины
Мужчины, больные гемофилией
Женщины — носительницы гена гемофилии
Женщины с неизвестным генотипом
Мужчины с неизвестным фенотипом
Женщины с неизвестным фенотипом
Артур, герцог Коннаутский
Леопольд, герцог Албанский
Елена, принцесса Вальдекская
Принцесса Беатриса
Генрих, принц Баттенбергский
Потомки породнились с королями Швеции и Дании
Принцесса Алиса
Граф Атлонский
Альфонс XIII, король Испании
Королева Эна
Лорд Леопольд Маунтбаттен
Лорд Морис Маунтбаттен (погиб в первой мировой войне)
Маркиз Кэрисбрук
Леди Мей Эбел-Смит (имеет детей)
Виконт Трематон (погиб в автомобильной катастрофе)
Морис (умер в детстве)
Принц Астурийский (погиб в автомобильной катастрофе)
Принц Джейм (глухонемой)
Принцесса Беатриса (есть дети)
Принцесса Мария (есть дети)
Принц Хуан
Принц Гонзало (погиб в автомобильной катастрофе)
(Умер в детстве)
Король Хуан Карлос I

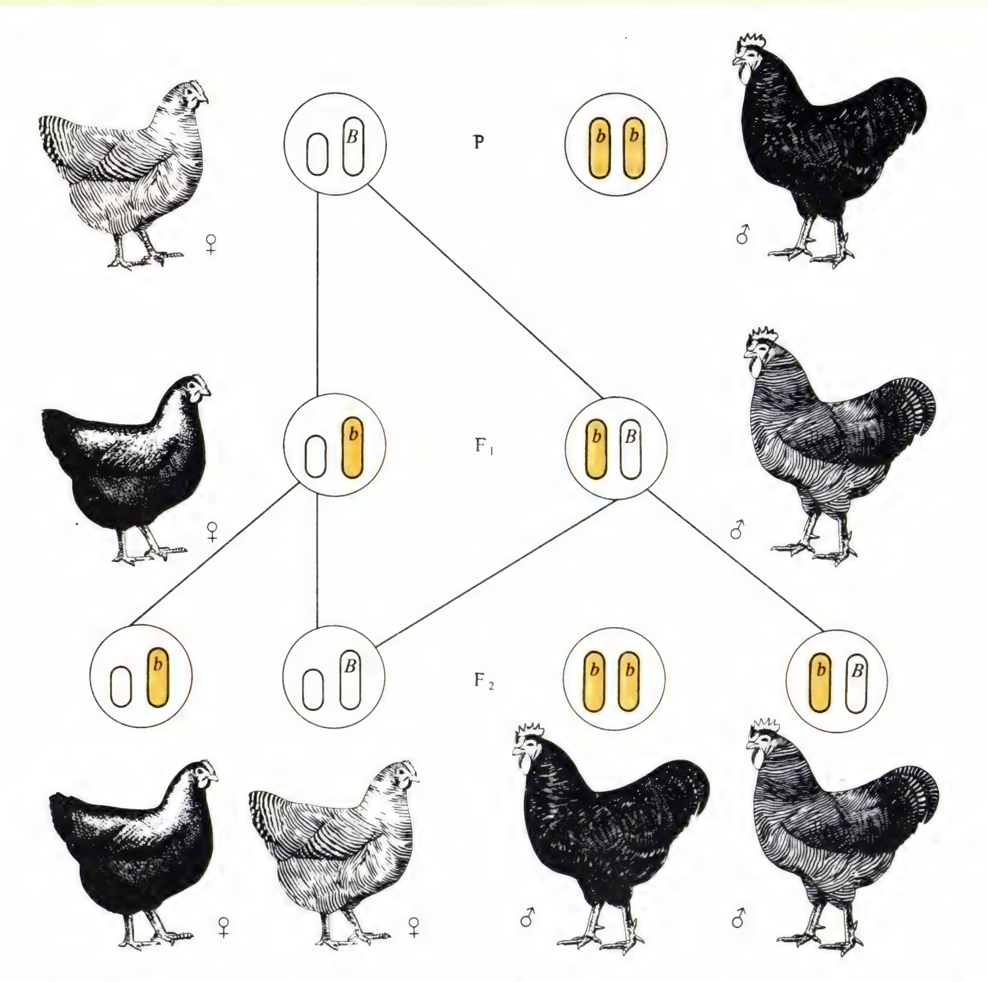


Рис. 3.12. Сцепленное с полом наследование у кур; скрещивание рябой курицы с гладким петухом. Ген рябой окраски (*B*) доминантен по отношению к гладкой окраске (*b*). У кур самки гетерогаметны, следовательно, куры передают X-хромосому только сыновьям, а дочери получают X-хромосому от отца. В результате дочери имеют рецессивный фенотип, унаследованный от отца, а сыновья — доминантный фенотип матери. Этот тип наследования отличается от изображенного на рис. 3.5, при котором доминантный фенотип матери наследуется всеми сыновьями и дочерьми.

повреждении тканей кровотечение довольно быстро останавливается вследствие образования сгустков крови. Существуют по меньшей мере три типа гемофилии, два из которых обусловлены рецессивными сцепленными с полом генами, а один – очень редкий – определяется рецессивным аутосомным геном. Каждый из этих генов имеет отношение к одному из факторов, необходимых для нормального свертывания крови. Знаменитый пример сцепленного с полом наследования гемофилии представляет собой родословное древо некоторых правящих династий Европы, восходящее к королеве Виктории (рис. 3.11). Поскольку среди ее предков случаи гемофилии неизвестны, то естественно предположить,

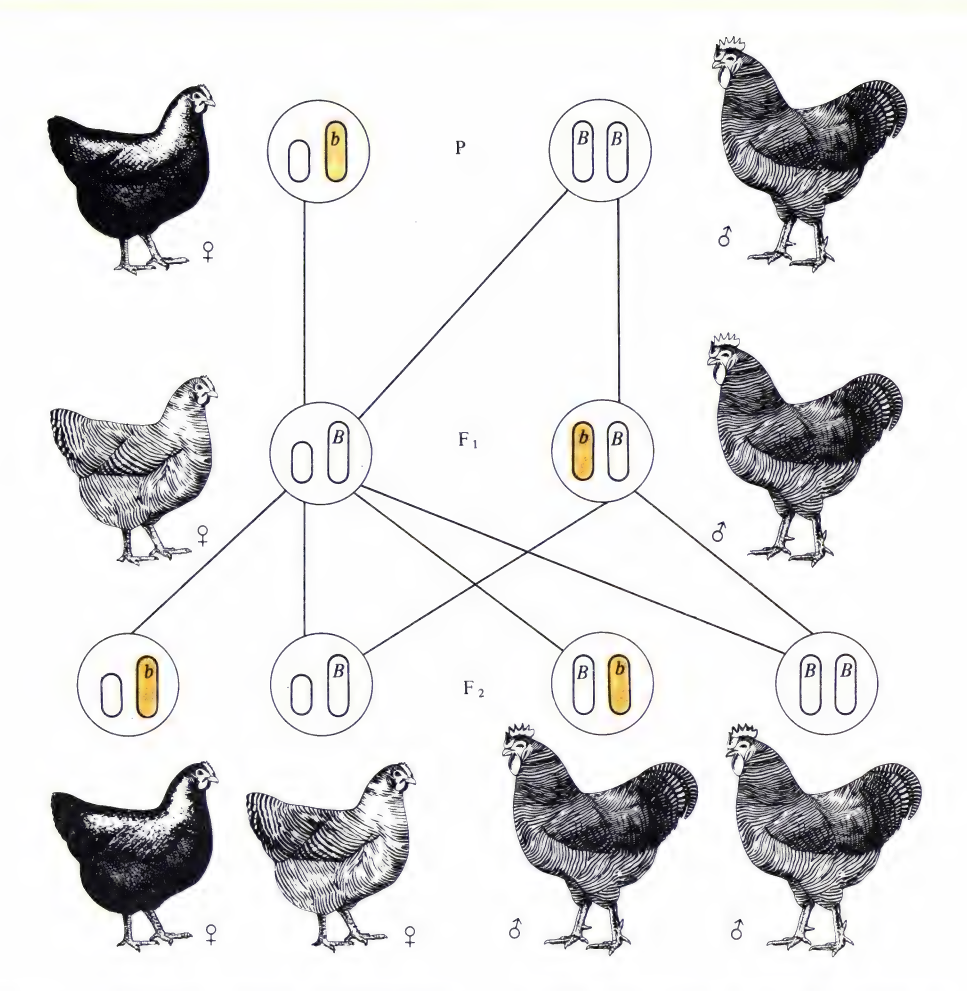


Рис. 3.13. Сцепленное с полом наследование у кур: скрещивание гладкой курицы с рябым петухом. Все сыновья и дочери наследуют доминантный фенотип отца. Характер наследования отличается от изображенного на рис. 3.6, при котором доминантный фенотип отца проявлялся только у дочерей.

что аллель, ответственный за гемофилию, возник в результате мутации в гамете одного из ее родителей.

Характер наследования сцепленных с полом признаков, описанный для дрозофилы и человека, меняется на противоположный, когда гетерогаметным полом являются самки. Например, у птиц, бабочек и некоторых рыб именно самки гемизиготны по сцепленным с полом признакам, и они передают гены, определяющие такие признаки, только своим сыновьям, тогда как самцы передают соответствующие гены как сыновьям, так и дочерям (рис. 3.12 и 3.13).

Y-хромосома

Обсуждавшиеся до сих пор гены, сцепленные с полом, расположены в X-хромосоме и не имеют гомологичных аллелей в Y-хромосоме. Поэтому самцы (точнее, гетерогаметный пол) гемизиготны по сцепленным с полом генам, и эти гены всегда проявляются в их фенотипе, даже если они рецессивны.

Содержатся ли вообще какие-то гены в Y-хромосоме? Большинство генов, имеющихся в X-хромосоме, в Y-хромосоме отсутствует, однако определенную генетическую информацию она все-таки несет. Различают два типа такой информации: во-первых, содержащуюся в генах, присутствующих только в Y-хромосоме, и, во-вторых, в генах, присутствующих как в Y-, так и в X-хромосоме.

У видов, самцы которых гетерогаметны, Y-хромосома передается от отца всем его сыновьям, и только им. Следовательно, для генов, содержащихся только в Y-хромосоме, характерно *голандрическое наследование*, т.е. они передаются только от отца к сыну и проявляются у самцов.

У человека наличие Y-хромосомы – необходимое условие принадлежности к мужскому полу: организмы, обладающие одной X-хромосомой в отсутствие Y-хромосомы, характеризуются женским фенотипом, хотя большинство из них стерильны (этот генотип определяет так называемый синдром Тернера; см. гл. 21). Вообще, по-видимому, присутствие Y-хромосомы необходимо у животных для возникновения мужских половых признаков (или женских, если гетерогаметным полом являются самки) или, во всяком случае, для плодовитости. У *D. melanogaster* особи с одной X-хромосомой в отсутствие Y-хромосомы фенотипически выглядят как самцы, однако они стерильны: содержащиеся в Y-хромосоме гены необходимы для сперматогенеза.

У *D. melanogaster* известны гены, представленные как в Y-, так и в X-хромосоме. Носители рецессивной мутации *bobbed* (*bb*) в гомозиготном состоянии характеризуются более короткими и тонкими щетинками, чем мухи дикого типа. Ген расположен в ядрышковом организаторе, т.е. в участке хромосом, ответственном за формирование ядрышка в интерфазе клеточного деления. При скрещивании самок, гомозиготных по рецессивному аллелю, с гетерозиготными самцами наблюдается необычное расщепление. Если носителем доминантного аллеля служит X-хромосома самца, то все самки в F_1 нормальны, а самцы обладают мутантным фенотипом ($X^{bb}Y^{bb}$). Если же носителем доминантного аллеля является Y-хромосома гетерозиготного отца ($X^{bb}Y^{bb+}$), то в потомстве F_1, напротив, все самки имеют мутантный фенотип ($X^{bb}X^{bb}$), а самцы – нормальный ($X^{bb}Y^{bb+}$).

У человека в Y-хромосоме содержатся по крайней мере три гена, один из которых необходим для дифференциации семенников, второй требуется для проявления антигена гистосовместимости, а третий оказывает влияние на размер зубов.

Определение пола

Принадлежность к определенному полу – важная особенность фенотипа особи. При чтении этой главы становится все более ясно, что самки и самцы обладают различной хромосомной конституцией. В этом раз-

Таблица 3.1. Определение пола у *Drosophila melanogaster*

Число X-хромосом	Число наборов аутосом (A)	X/A	Фенотипический пол
3	2	1,5	Метасамка*)
2	2	1	Нормальная самка
2	3	0,67	Интерсекс
1	2	0,5	Нормальный самец
1	3	0,33	Метасамец*)

*) Иногда их называют «суперсамка» и «суперсамец». Мухи с такими генотипами очень ослаблены и часто не доживают до стадии половозрелости.

деле мы рассмотрим более основательно роль, которую хромосомы играют в определении пола.

У человека, так же как у дрозофилы, клетки женских особей содержат по две X-хромосомы, а мужских – одну X- и одну Y-хромосому. Такое же различие между полами характерно для большинства позвоночных, многих насекомых и других беспозвоночных, а также для многих *двудомных* растений (т. е. растений, у которых существуют мужские и женские экземпляры). Однако генетические основы определения пола у всех этих организмов неодинаковы.

У *D. melanogaster* носители единственной X-хромосомы, не имеющие Y-хромосомы, обладают нормальным мужским фенотипом (правда, при этом стерильны). Фенотип по полу *D. melanogaster* определяется соотношением между числом X-хромосом и числом наборов аутосом (A). Если отношение X/A = 1, муха имеет фенотип самки, если X/A = 1/2 – фенотип самца, если X/A больше 1/2, но меньше единицы, то развивается особь с фенотипом, промежуточным между мужским и женским, т. е. «интерсекс» (табл. 3.1). Механизм, посредством которого отношение числа X-хромосом к числу наборов аутосом определяет развитие того или иного фенотипа, не вполне понятен. Кроме того, у *D. melanogaster* известны конкретные гены, влияющие на определение пола. Мутантный ген *tra* (трансформатор) в гомозиготном состоянии придает особям с двумя X-хромосомами, т. е. «генетическим» самкам, фенотипический облик самцов (которые, однако, стерильны).

В отношении механизмов определения пола человек отличается от дрозофилы тем, что для формирования нормального мужского фенотипа необходимо присутствие Y-хромосомы. Механизмы определения пола у дрозофил и млекопитающих обсуждаются в гл. 17.

У птиц и бабочек самцы являются гомогаметным полом, а самки – гетерогаметным (типа XY или XO). Половые хромосомы у этих видов иногда обозначают буквами Z и W, выделяя таким образом данный способ определения пола, при этом самцы обозначаются символом ZZ, а самки – ZW или ZO (рис. 3.14).

Совершенно другой механизм определения пола, называемый *гаплодиплоидией*, широко распространен у пчел и муравьев. У этих организмов нет половых хромосом: самки – это диплоидные особи, а самцы (трутни) – гаплоидные. Самки развиваются из оплодотворенных яиц, а из неоплодотворенных развиваются трутни. У трутней, таким образом, нет отцов, хотя у них и есть деды по материнской линии. В процес-

6 – 1215

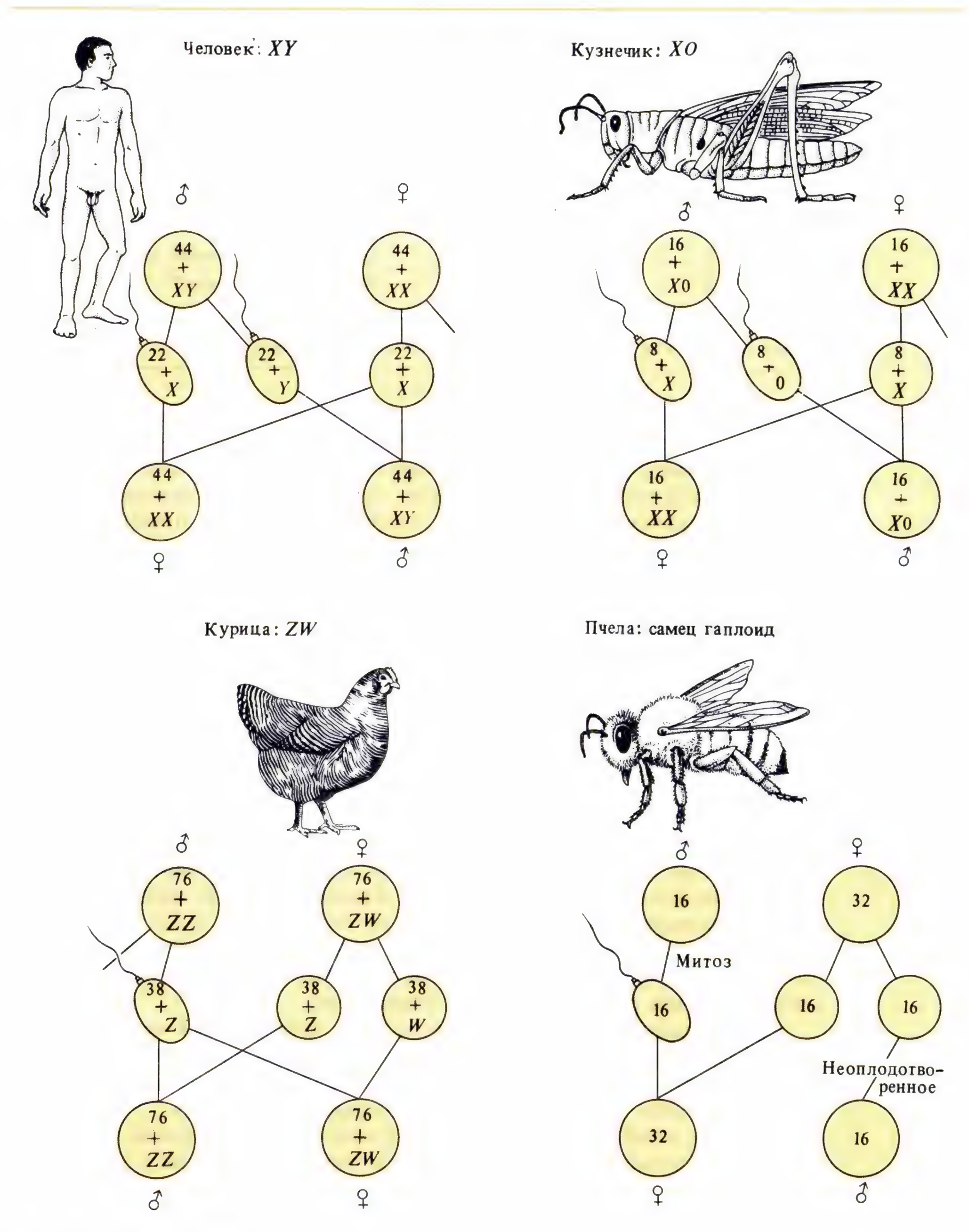


Рис. 3.14. Четыре типа определения пола.

се сперматогенеза у трутней не происходит редукции числа хромосом. Из оплодотворенной яйцеклетки может развиться либо «матка»–крупная, способная к размножению самка, либо стерильная рабочая самка. Это зависит от условий выкармливания личинки рабочими особями.

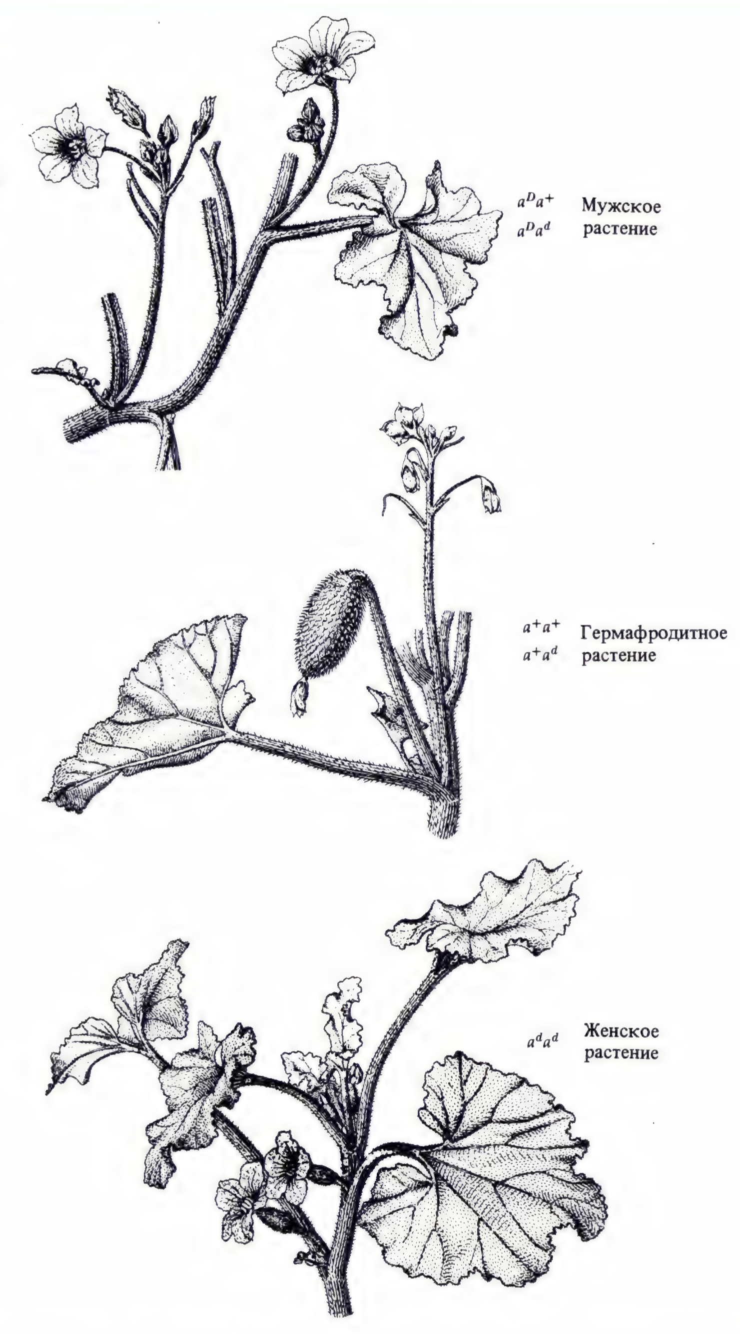


Рис. 3.15. За определение пола у растения *Ecballium elaterium* из семейства тыквенных ответственны три аллеля одного локуса: a^D обусловливает мужской пол, a^+ – гермафродитизм, a^d – женский пол. Аллель a^D доминантен по отношению к a^+ и a^d, аллель a^+ доминантен по отношению к a^d.

Большинство растений и некоторые животные *гермафродиты*, т. е. в одной особи сочетаются свойства обоих полов. Большинство гермафродитов размножаются путем самооплодотворения (самоопыления), хотя у некоторых животных и отдельных видов растений строение половых органов допускает перекрестное оплодотворение.

Некоторые растения могут быть как *однодомными* (гермафродитными), так и двудомными. Фернандо Галан показал, что у *Ecballium elaterium*, растения из семейства тыквенных, система определения пола включает серию из трех аллелей, a^D, a^+ и a^d, причем a^D доминирует над остальными двумя аллелями, а a^+ доминантен по отношению к a^d. Аллель a^D определяет мужской пол, a^+ – гермафродитизм и a^d – женский пол. Соотношение между пятью возможными генотипами и фенотипическим проявлением пола представлено на рис. 3.15. (Гомозигот a^Da^D не существует, поскольку они могли бы возникнуть лишь в результате скрещивания между двумя самцами.)

Наконец, у некоторых животных определение пола зависит от внешних условий. У морского червя *Bonellia* особи, которые в личиночной стадии остаются свободно плавающими, становятся самками, а личинки, прикрепившиеся к телу взрослой самки, превращаются в самцов в результате маскулинизирующего действия гормона, выделяемого самкой. Обитающие в коралловых рифах рыбы *Labroides dimidiatus* живут стайками, включающими нескольких самок и одного самца. Когда самец погибает, то доминирующая в группе самка начинает отгонять приближающихся к группе самцов и, если это ей удается, начинает ухаживать за самками и вести себя как самец во всех остальных отношениях; примерно через две недели она (теперь уже он) начинает продуцировать способную к оплодотворению икры сперму. Механизм определения пола у *Bonellia* и *Labroides* экономичен в том смысле, что необходимость размножения не создает тем не менее избытка самцов.

Отношение полов

Численным отношением полов или просто отношением полов называется частное от деления числа самцов на число самок. Эта величина у большинства раздельнополых организмов близка к единице, что является прямым результатом хромосомного механизма определения пола (рис. 3.16). Самки (точнее, гомогаметный пол) продуцируют га-

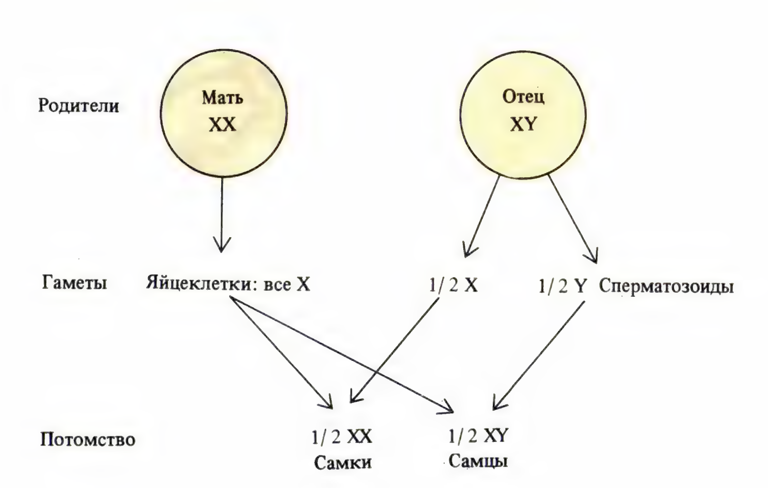


Рис. 3.16. Хромосомный механизм определения отношения численности полов. Количество самок и самцов приблизительно одинаково у тех организмов, у которых один пол гомогаметный, а другой – гетерогаметный. Гомогаметные особи продуцируют в отношении половых хромосом только один тип гамет, а гетерогаметные – два типа гамет в равном количестве.

меты одного типа, X, самцы – двух типов, X и Y, причем в равном количестве. В результате зиготы XX и XY также образуются в одинаковом количестве.

У пчел и родственных им насекомых отношение полов определяется долей оплодотворенных яиц; не удивительно, что оно не равно единице, а обычно много меньше. У тех видов, у которых пол определяется внешними условиями, отношение полов обычно отлично от единицы, причем часто, как, например, у *L. dimidiatus*, бывает значительно меньшим единицы.

На отношение полов могут влиять некоторые гены. Например, рецессивные *летальные* гены (т. е. гены, приводящие к гибели организма до достижения половозрелости) в X-хромосоме дрозофил убивают гемизиготных самцов, но оставляют невредимыми гомозиготных самок. У *Drosophila pseudoobscura* существует линия, в которой потомство состоит почти исключительно из самок, вероятно, вследствие того, что содержащие Y-хромосому гаметы самцов либо не возникают вовсе, либо не способны оплодотворять яйцеклетки.

Литература

Bridges C. B. (1916). Nondisjunction as proof of the chromosome theory of heredity, Genetics, **1,** 1–52, 107–163.

Bridges C. B. (1925). Sex in relation to chromosomes and genes, Amer. Nat., **59,** 127–137.

Galán F. (1964). Teoría genética del sexo zigótico en el caso de *Ecballium elaterium*, Revista de Biología, **4,** 187–220.

Miller O. J., Siniscalco M. (1982). Report of the Committee on the Genetic Constitution of the X and Y Chromosome, Cytogenet. Cell Genet., **32,** 179–190.

Morgan L. V. (1922). Non criss-cross inheritance in *Drosophila melanogaster*, Biol. Bull., **42,** 267–274.

Morgan T. H. (1910). Sex-limited inheritance in *Drosophila*, Science, **32,** 120–122.

Morreale S. J., Ruiz G. J., Spotila J. R., Standora E. A. (1982). Temperature-dependent sex determination, Science, **216,** 1245–1247.

Sutton W. S. (1903). The chromosomes in heredity, Biol. Bull., **4,** 231–251.

Voeller B., 1968. The Chromosome Theory of Inheritance, Appleton-Century-Crofts, New York.

Zulueta A. de (1925). La herencia ligada al sexo en el coleóptero *Phytodecta variabilis* (Ol.), EOS, Revista Española de Entomología, **1,** 203–209.

Ключевые слова и понятия

Гапло-диплоидия
Гемизиготность
Гермафродитизм
Голандрическое наследование
Нерасхождение первичное и вторичное
Половые хромосомы
Сцепленное с полом наследование
Хромосомная теория наследственности

Задачи

3.1. У супругов, зрение каждого из которых нормально, четверо детей: две дочери и два сына. У первой дочери зрение нормальное; у нее есть три сына, два из которых дальтоники. У второй дочери, а также у ее пяти сыновей зрение нормальное. Первый сын дальтоник; у него две дочери и два сына, и все видят нормально. Второй сын и четверо его сыновей также имеют нормальное зрение. Каковы генотипы дедушки с бабушкой, всех их детей, их супругов и внуков?

3.2. Если женщина, отец которой страдал гемофилией, вышла замуж за здорового мужчину, то какова вероятность того, что у ее ребенка будет гемофилия? Предположим теперь, что отец мужа также был болен гемофилией; какова вероятность в этом случае?

3.3. У дрозофилы ген редуцированных крыльев (*vg*) рецессивен и расположен в аутосоме; ген желтой окраски тела (*y*) также рецессивен, но сцеплен с полом. Если гомозиготную по этим генам самку скрестить с нормальным самцом, то как будет выглядеть потомство в F_1 и F_2?

3.4. Предположим, что у желтой самки с редуцированными крыльями из условия предыдущей задачи Х-хромосомы связаны общей центромерой. Какое потомство можно ожидать от скрещивания с нормальным самцом?

3.5. Петух гетерозиготен по сцепленной с полом рецессивной летали. Каково отношение полов в потомстве от скрещивания такого петуха с нормальными курами?

3.6. Иногда у кур яичники не развиваются или не функционируют, а вместо них развиваются семенники. У некоторых из таких «петухов» с переопределенным полом могут быть цыплята. Какого типа потомство можно ожидать от скрещивания таких петухов с нормальными курами? Каково будет отношение полов в потомстве с учетом того, что яйца типа WW не способны к развитию?

3.7. Рябую курицу скрещивали с гладким петухом. В F_2 проводились все возможные типы скрещиваний. Каково будет потомство в F_3?

3.8. Какие типы потомства и в каком отношении возникают при скрещивании гладкой курицы с гетерозиготным рябым петухом?

3.9. У *Ecballium elaterium* однодомные (гермафродитные) растения классифицируют как вариант *elaterium*, а двудомные (мужские и женские) – как вариант *dioicum*. Обычно используются следующие генетические обозначения: *E. elaterium elaterium* обозначается a^+a^+, мужские растения *E. elaterium dioicum* – a^Da^d, женские растения *E. e. dioicum* – a^da^d. Предположим, что в природе растения обычно имеют генетическую конституцию дикого типа. Каковы будут результаты скрещиваний: а) *dioicum* ♀ × *dioicum* ♂; б) *elaterium* × × *elaterium*; в) *elaterium* × *dioicum* ♂; г) *dioicum* ♀ × *elaterium*?

3.10. Предположим, что в потомстве от скрещивания типа в) из условий предыдущей задачи плодовиты любые типы перекрестного опыления. Какие типы растений и в каких пропорциях будут присутствовать в потомстве от всех типов такого скрещивания? Ответьте на тот же вопрос применительно к результатам скрещивания типа г).

3.11. В потомстве от скрещивания двух растений *Ecballium elaterium* возникают исключительно гермафродитные растения. При их скрещивании в F_2 одну четверть потомства составляют двудомные женские растения и три четверти – однодомные растения. Каковы генотипы представителей всех трех поколений?

3.12. Самка медоносной пчелы *Apis mellifera* диплоидна, а трутни гаплоидны. Существует, однако, локус со множественными аллелями, влияющий на определение пола у диплоидных особей. Все диплоидные особи, гетерозиготные по этому локусу,– самки, а гомозиготные по любому из аллелей – самцы. Гомози-

готные самцы не достигают половозрелости, поскольку обычно поедаются рабочими пчелами на личиночной стадии в первые трое суток после вылупления из яичек. Таким образом, гомозиготный генотип в естественных условиях леталену. Однако изъятых из улья личинок таких самцов можно довести до стадии половозрелости. В этом локусе насчитывается около двадцати аллелей, обозначаемых символами A_1, A_2, ..., A_{20}. Пусть в потомстве некоторой оплодотворенной гаплоидным трутнем матки лишь половина яичек способна к развитию (это хорошо заметно, поскольку половина ячеек в сотах остается пустой, и пустые ячейки распределены по сотам случайным образом). Что можно сказать о генетической конституции матки и трутня?

3.13. Предположим, что диплоидный трутень оплодотворяет матку, у которой в локусе, определяющем пол, один из аллелей идентичен аллелю трутня. Какой процент потомства будет жизнеспособен в улье?

3.14. Пусть число аллелей в локусе, определяющем пол, равно двадцати. Сколько существует генетически различных типов гаплоидных самцов? Диплоидных самцов? Самок?

3.15. Локализация гена в Y-хромосоме впервые была обнаружена Антонио де Зулуэта в 1925 году. Существуют четыре фенотипических класса жуков-листоедов *Phytodecta variabilis*: полосатый, желтый, красный и черный, отличающиеся окраской надкрылий. Все четыре фенотипа определяются аллелями одного гена, обозначаемыми e^l для полосатых жуков, e^y для желтых жуков, e^r для красных и e^b для черных. Характер доминирования среди этих аллелей можно описать неравенством $e^b > e^r > e^y > e^l$, где знак «$>$» означает «доминантен по отношению к». Ген расположен в половых хромосомах, причем все четыре аллеля могут быть локализованы как в X-, так и в Y-хромосоме. Зулуэта обнаружил, что полосатый фенотип очень редко встречается у самцов (0,5% всех самцов) и широко распространен у самок (59% всех самок). Как вы можете объяснить этот факт?

3.16. При скрещивании полосатой самки *Phytodecta variabilis* с желтым самцом в F_1 обнаружено 13 полосатых самок и 11 желтых самцов. В F_2 все самки (31) были полосатыми, а все самцы (29) – желтыми. Каковы генотипы родителей и потомства в F_1 и F_2? Используйте метод хи-квадрат для проверки вашей гипотезы.

3.17. Допустим, что вам неизвестен пол особей в поколениях F_1 и F_2 из скрещивания, описанного в предыдущей задаче. Могли бы такие результаты получиться, если бы ген окраски надкрылий не был сцеплен с полом? Используйте метод хи-квадрат для проверки гипотезы о несцепленности с полом данного гена уже с учетом половой принадлежности особей.

3.18. При скрещивании красной самки *Phytodecta variabilis* с красным самцом в потомстве оказалось 15 желтых самок, 15 красных самок и 34 красных самца. При скрещивании отдельных желтых самок из поколения F_1 с отдельными красными самцами из того же поколения соотношение фенотипов в потомстве оказалось в разных скрещиваниях различным: примерно в половине скрещиваний все самцы и самки в потомстве были красными, в другой половине самцы имели красную окраску, а самки примерно в равном числе были желтыми и полосатыми. Каковы вероятные генотипы родителей?

3.19. У некоторых тропических рыб, таких как меченосцы и гуппии, в некоторых линиях гетерогаметными бывают самцы, а в других – самки. В диких линиях самки часто бывают типа XX, самцы типа XY; в некоторых аквариумных линиях самки имеют генотип ZW, самцы – ZZ. При перекрестных скрещиваниях можно получить самцов с комбинациями половых хромосом типа ZZ, XZ, XY или YY, а самок с комбинациями XX, XW, ZW илиYW. Каково будет отношение полов в следующих типах скрещиваний: а) ♀ XX × ♂ ZZ; б) ♀ ZW × ♂ XZ; в) ♀ XW × ♂ XZ?

4

Природа генетического материала

Связь между менделевскими генами и хромосомами клетки была твердо доказана Бриджесом в 1916 году (гл. 3). Ему удалось установить, что все гены имеют некоторые общие свойства. Во-первых, они способны создавать собственные копии (самореплицироваться) во время удвоения хромосом в период, предшествующий мейозу. Во-вторых, в результате мутаций гены могут переходить в различные аллельные формы, что также предполагает способность к саморепликации. Редкость мутаций указывает на то, что гены представляют собой очень стабильные структуры, способные к точной дупликации. В-третьих, гены различными способами оказывают влияние на фенотип. Проявление альтернативных признаков, как впервые заметил Мендель (длинный или короткий стебель, гладкие или морщинистые семена и т. п.), служит основным критерием идентификации генов при наблюдениях над расщеплением аллелей в потомстве различающихся по данному признаку родителей. Устойчивая передача признаков из поколения в поколение, нарушаемая лишь мутациями, ставит перед нами вопросы: как определяются такие признаки? Что представляет собой образующее ген вещество, способное к саморепликации, мутациям и фенотипическому проявлению?

Ответы на такие фундаментальные вопросы неизбежно очень сложны, когда вопросы формулируются применительно к росту, развитию и размножению высших организмов, например человека, или даже менее сложных организмов, таких как мухи или растения гороха. Чем проще устроен организм, тем больше он подходит для решения подобных вопросов. Первые сведения о физических и химических основах наследственности были получены при работе с микроорганизмами.

Бактерии, ранее изучавшиеся лишь постольку, поскольку они являются возбудителями болезней человека и домашних животных, оказались удобным объектом для исследования наследственности и природы генетического материала. Вирусы, устроенные проще, чем бактерии, оказались и более удобным объектом. Вирусы способны размножаться лишь внутри живых клеток. Бактериофаги проникают в бактериальные клетки; другие вирусы поражают клетки растений и животных, и многие из них патогенны.

Еще в 1922 г. генетик Мёллер отметил два важных общих свойства бактериофагов и генов: и те и другие способны к размножению, создавая точные копии самих себя; и те и другие в результате мутаций могут принимать новые формы. Мёллер писал[1]:

«С другой стороны, если тельца Д'Эрелля (бактериофаги) действительно представляют собой гены, в основных чертах сходные с генами хромосом, то это дает нам возможность подступиться к проблеме гена с совершенно новых позиций... Было бы слишком опрометчиво назвать эти тельца генами, однако мы должны признать, что какие-либо отличия между генами и ими нам не известны. Следовательно, мы не можем категорически отвергать возможность того, что когда-нибудь мы научимся растирать гены в ступке, а затем снова собирать их в пробирке. Должны ли генетики превратиться в бактериологов, химиков и физиков, одновременно оставаясь при этом зоологами и ботаниками? Хотелось бы надеяться».

В 1922 г. генетики считали, что менделевские гены могут находиться лишь в ядрах клеток. Бактериофаги явно много мельче бактериальных клеток. Не могут ли они представлять собой «высвободившиеся» гены, способные к размножению, лишь попадая в бактериальную клетку? Эта гипотеза стимулировала множество исследований бактериофагов и других вирусов, исследований, частично подтвердивших идею Мёллера.

В этой главе мы рассмотрим, как изучение бактерий и вирусов привело к пониманию химической природы генетического материала и как были определены его физическая структура и свойства. В последующих главах мы проанализируем, какой вклад внесло изучение микроорганизмов в наши представления об организации и механизмах проявления генетического материала.

Бактерии как экспериментальный объект

Наиболее интенсивно исследуемый вид бактерий – это обитатель кишечника человека *Escherichia coli.* Эта бактерия легко выращивается в жидкой среде, содержащей некоторые соли ($NaCl$, NH_4Cl, KH_2PO_4, $CaSO_4$), ничтожные количества некоторых других необходимых элементов и какой-нибудь простой источник углерода, например глюкозу. Из этих веществ *E. coli* способна синтезировать все сложные органические молекулы, образующие клетку (такие бактерии называются *прототрофами*). В питательной среде всего лишь за один день плотность популяции, возникшей из единственной клетки *E. coli*, может достичь $2–3 \cdot 10^9$

---

[1] *Müller HI*. (1922). American Naturalist, **56**, 32.

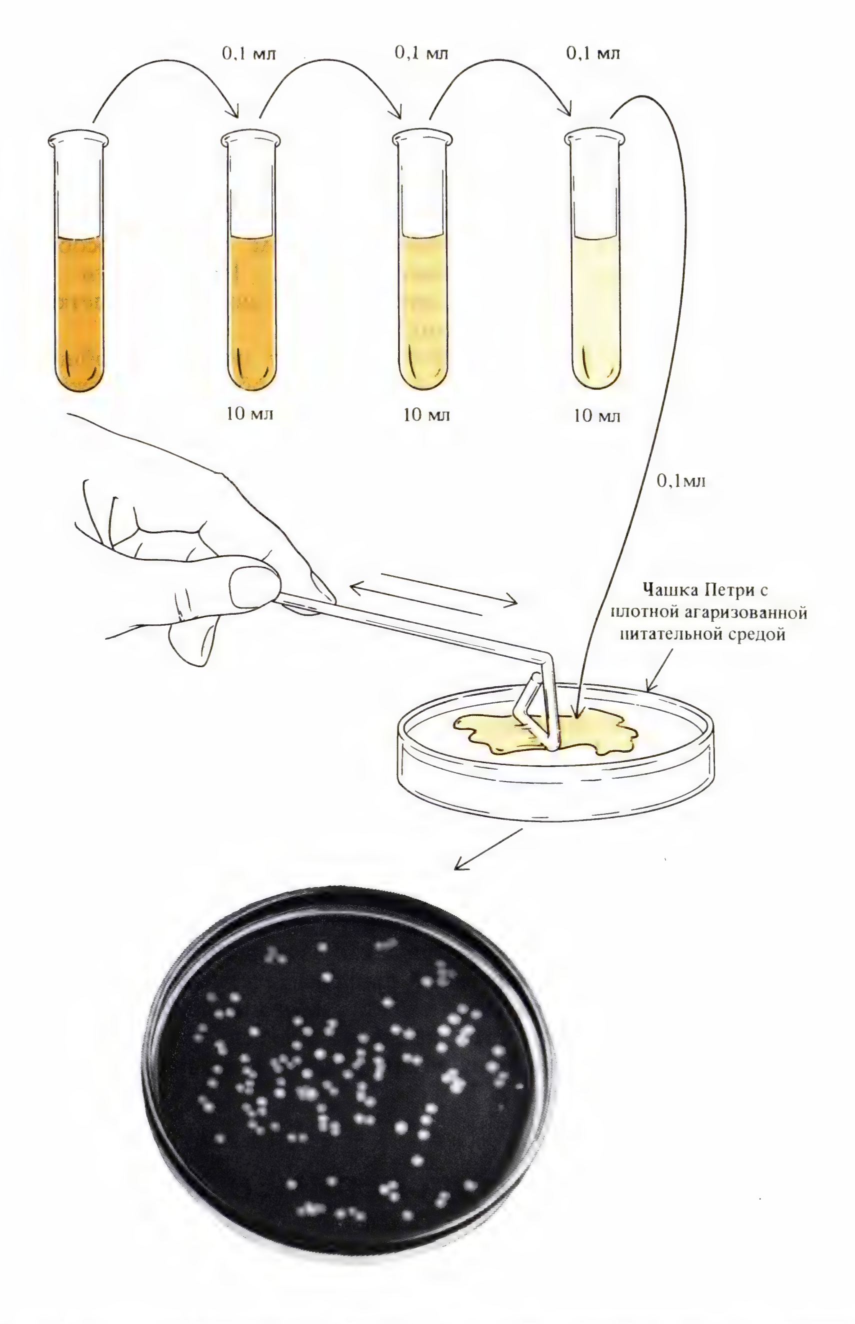


Рис. 4.1. Для определения количества живых бактериальных клеток в культуре ее образец последовательно разводят и фиксированный объем суспензии из последнего разведения высевают на твердую среду. После инкубации каждая бактериальная клетка, размножаясь, образует видимую невооруженным глазом колонию своих потомков. Подсчитав число колоний на чашке, легко узнать концентрацию бактериальных клеток в исходной культуре. Например, на чашке выросло 100 колоний, следовательно, в 0,1 мл разбавленной культуры содержалось 100 клеток, а их число в исходной пробе равно (100 клеток/0,1 мл)$\cdot 10^2 \cdot 10^2 \cdot 10^2 = 10^9$ клеток в 1 мл (*Stent G. S., Calendar R.* 1978. Molecular Genetics, 2nd ed., W. H. Freeman, San Francisco.) [Имеется перевод: *Стент Г., Кэлиндар Р.* 1981. Молекулярная генетика, М., Мир.]

бактерий в миллилитре. Многие другие бактерии, особенно паразитические, не способны сами синтезировать некоторые органические соединения, и потому присутствие соответствующих соединений в среде необходимо для их существования. Такие бактерии называются *ауксотрофами.*

Количество живых клеток в бактериальной культуре можно приблизительно подсчитать, если развести определенным образом культуру и фиксированный объем суспензии высеять в чашку Петри на поверхность твердой питательной среды (с агар-агаром) (рис. 4.1). Если культура разведена достаточно для того, чтобы отдельные клетки оказались на значительном расстоянии друг от друга, то при инкубации чашки Петри в подходящих условиях каждая бактерия начинает быстро делиться и формирует на поверхности агара различимую невооруженным глазом колонию. Количество таких колоний можно подсчитать и, умножив полученную величину на коэффициент разведения, определить число клеток в исходной культуре (см. рис. 4.1). Этот способ дает возможность изучать потомство любой отдельной клетки. Например, можно получить чистую культуру любой мутантной бактерии, присутствовавшей в исходной суспензии клеток путем ее разведения и посева в чашке Петри. Этот простой метод лежит в основе всех исследований по генетике бактерий и использовался во всех обсуждаемых ниже экспериментах.

Результаты, полученные на бактериях, внесли значительный вклад в наше понимание механизмов наследственности. В начальный период развития генетики исследования велись главным образом на высших организмах, размножающихся, так же как и человек, половым путем. У бактерий некоторые формы полового процесса были обнаружены лишь в 1946 году. Только постепенно ученые осознали, что механизмы наследования признаков у человека и бактерий в основах своих имеют очень много общего.

Экспериментальные исследования бактериофагов

Исследования, проведенные на фагах, внесли неоценимый вклад в наше понимание механизмов наследственности. Заражая бактериальные культуры, легко получить колоссальные популяции фагов – до 10^{11} частиц в 1 мл и более.

Титр фагов в культуре определяется следующим образом. Суспензия фаговых частиц соответствующим образом разводится, смешивается с определенным объемом культуры живых бактериальных клеток в полужидком агаре, а затем эта смесь равномерно распределяется по поверхности твердой питательной среды в чашке Петри и затвердевает. После инкубации живые бактерии, размножаясь, образуют плотный и видимый невооруженным глазом сплошной слой клеток (*газон*). В тех же местах, которые инфицированы фаговыми частицами, образуются *негативные колонии* (или *бляшки*) (рис. 4.2). Пробы, взятые из этих бляшек, способны заражать бактерии в других чашках потомством исходного фага. Если фаговых частиц в бактериальной культуре относительно мало, то каждая негативная колония на бактериальном газоне содержит потомство одной индивидуальной частицы фага. Концентра-

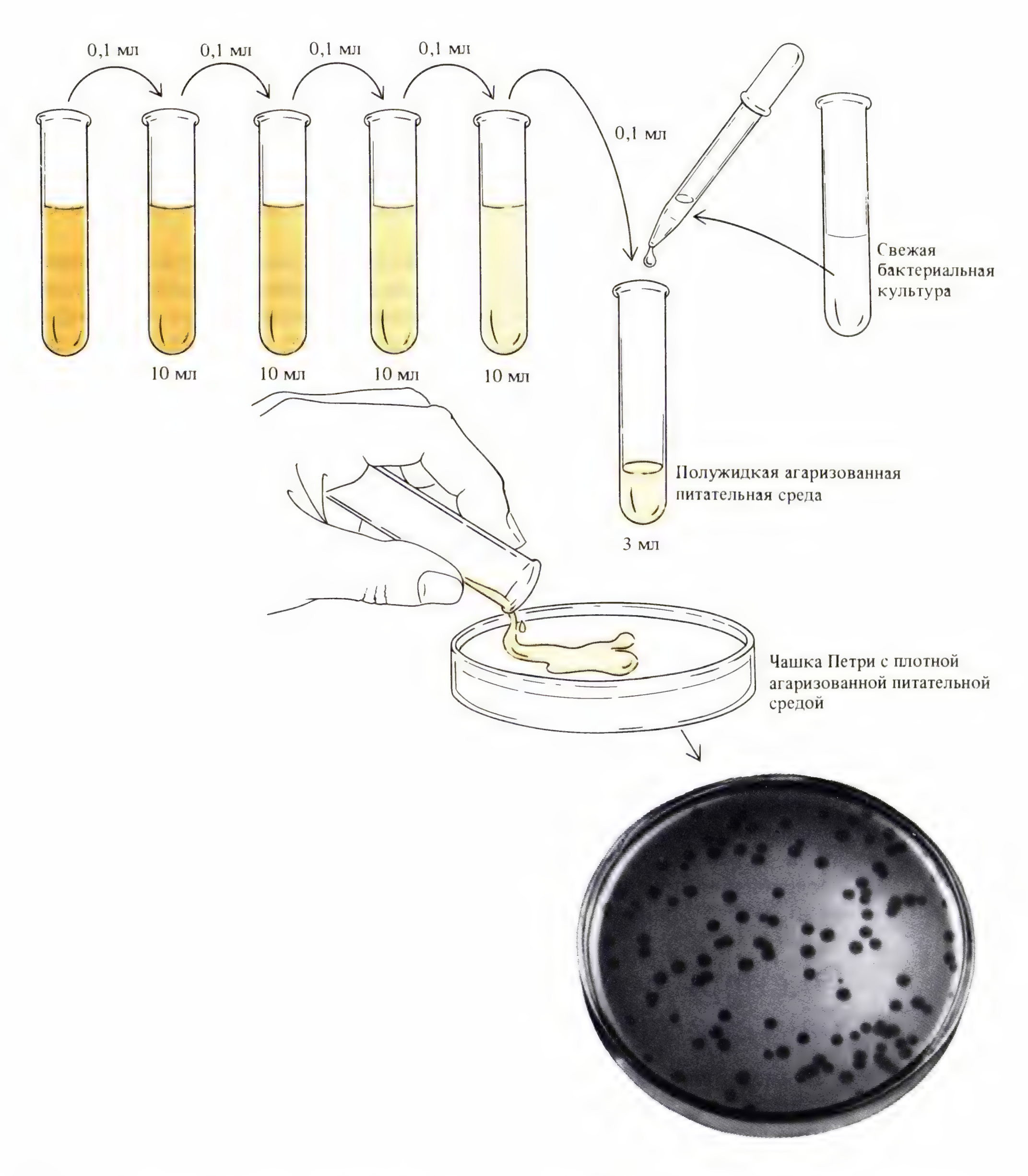


Рис. 4.2. Для определения количества жизнеспособных фаговых частиц образец препарата последовательно разводят и фиксированный объем разбавленной фаговой культуры смешивают с определенным объемом полужидкого питательного агара, содержащего несколько капель свежей бактериальной культуры (примерно 10^8 клеток). Затем полужидкий агар, смешанный с бактериями и фагами, выливают на поверхность твердой среды в чашку Петри, где он и застывает. После инкубации бактерии образуют на поверхности чашки плотный газон. В тех местах, где заражение фагом вызвало лизис бактерий, в газоне образуются «дырки». Число «дырок», или бляшек, отражает число частиц фага, попавших в полужидкий агар. Если на поверхности чашки насчитывается 100 бляшек, значит, в 0,1 мл разбавленной культуры содержалось 100 фаговых частиц. Число фагов в исходной культуре, следовательно, было равно (100 фагов/0,1 мл)$\cdot 10^2 \cdot 10^2 \cdot 10^2 \cdot 10^2 = 10^{11}$ фагов в 1 мл. (*Stent G.S., Calendar R.* 1978. Molecular Genetics, 2nd ed., W.H. Freeman, San Francisco.) [Имеется перевод: *Стент Г., Кэлиндар Р.* 1981. Молекулярная генетика, М., Мир.]

цию (титр) фага в исходной культуре можно определить, подсчитав число бляшек на газоне и умножив его на коэффициент разведения, как это показано на рис. 4.2. Заражая свежую культуру бактерий материалом из одной негативной колонии, можно получить чистый препарат фага.

ДНК – трансформирующий фактор пневмококка

В наши дни общеизвестно, что дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – носитель наследственности у всех прокариот и эукариот. Впервые это было показано в исследованиях на бактериях пневмококках. Некоторые линии (штаммы) этого микроорганизма вызывают воспаление легких у млекопитающих. Бактерии патогенных штаммов синтезируют полисахаридную капсулу, слизистая поверхность которой защищает бактериальную клетку от фагоцитов иммунной системы зараженного животного. Штаммы пневмококков можно отличить друг от друга по антителам, продуцируемым животными в ответ на попадание в их организм различных полисахаридов и белков соответствующей линии бактерий. Именно по антителам на капсулярные полисахариды различают патогенные штаммы; их обозначают как тип I, тип II, тип III и т.д.

Патогенные штаммы, выращиваемые на твердой питательной среде в лаборатории, образуют блестящие гладкие колонии; такую морфологию колонии имеют из-за синтезируемых бактериями слизистых оболочек. Иногда возникают мутантные клетки, утратившие способность к ферментативной активности, необходимой для синтеза слизистой оболочки. Эти мутантные клетки образуют колонии с шероховатой поверхностью; они в отличие от родительских клеток S обозначаются буквой R (рис. 4.3). R-штаммы размножаются так же успешно, как и штаммы S, причем иногда происходят обратные мутации, восстанавливающие способность к синтезу слизистой оболочки. Тип капсулярных полисахаридов, синтезируемых в ревертантах, всегда совпадает с типом полисахаридов исходного родительского штамма: IIS ⇄ IIR, IIIS ⇄ IIIR и т.д. Следовательно, различные R-штаммы нетождественны: каждый из них соответствует родительскому штамму S.

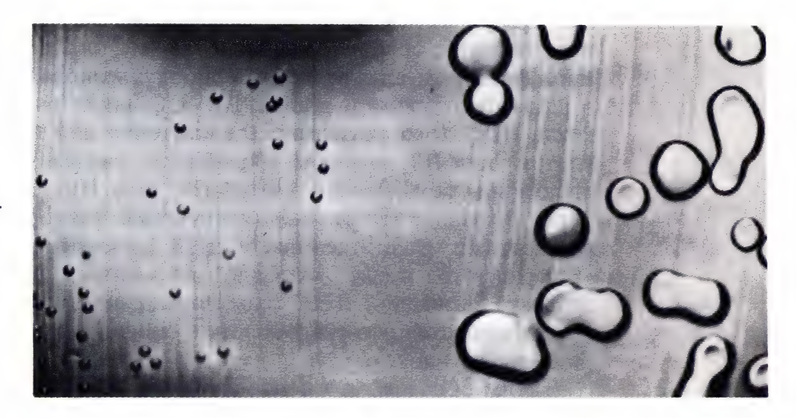


Рис. 4.3. Колонии пневмококков, растущие на питательной среде. Маленькие колонии принадлежат бактериям типа IIR, а большие блестящие колонии – трансформированному типу IIIS. (Prof. *Maclyn McCarty*, Rockfeller University.)

Бактерии R-штаммов непатогенны. Когда такие клетки попадают в организм животного, например мыши, то такая мышь обычно переносит заражение, вырабатывая антитела, ведущие к фагоцитозу и гибели бактериальных клеток. Однако мышь, зараженная бактериями S-штамма, неизбежно гибнет от воспаления легких, поскольку эти бактерии покрыты синтезируемой ими слизистой оболочкой. В 1928 г. Фредерик Гриффит показал, что если мыши ввести пневмококки штамма IIR вместе с убитыми нагреванием клетками типа IIIS, то мыши погибают от инфекции, которая, как показывает вскрытие, вызывается клетками типа IIIS. Контрольные эксперименты показали, что порознь ни инъекция клеток IIR, ни инъекция убитых нагреванием клеток IIIS не ведет к гибели мышей. Тот факт, что вызывающие инфекцию клетки синтезировали слизистую оболочку типа III, а не типа II, свидетельствовал о том, что эти клетки не могли возникнуть в результате обратной мутации в клетках штамма IIR (IIR $\rightleftarrows$ IIS). Гриффит пришел к заключению, что непатогенные клетки штамма IIR могут *трансформироваться* в патогенные убитыми нагреванием клетками штамма IIIS. Оказалось, что слишком высокая температура разрушает трансформирующий фактор, а слишком низкая температура не нарушает активность фермента, разрушающего трансформирующий фактор, и, следовательно, тоже подавляет трансформацию. Было показано, что при температуре 65°C уже прекращается ферментативная активность, но еще сохраняется активность трансформирующего фактора.

Впоследствии другие исследователи обнаружили, что трансформация непатогенных штаммов пневмококка в патогенные может осуществляться и в лабораторной культуре клеток. Изредка возникающие трансформированные клетки легко отделить от нетрансформированных, поскольку они не агглютинируются сывороткой, содержащей антитела против клеток типа IIR. Агглютинировавшие клетки IIR осаждаются хлопьями на дно культурального сосуда, тогда как трансформированные клетки не слипаются, а свободно размножаются, образуя мутную суспензию клеток IIIS (рис. 4.4). Развитие такого метода выделения трансформированных клеток in vitro («в пробирке») дало важное преимущество, поскольку позволило исследовать природу трансформирующего фактора убитых нагреванием клеток IIIS непосредственно, не вводя их мышам и не дожидаясь гибели последних.

Освальд Эвери, Колин Мак-Леод и Маклин Мак-Карти использовали этот метод для определения вещества, ответственного за трансформирующую активность убитых нагреванием клеток IIIS. Результаты их исследований, опубликованные в 1944 г., показали, что трансформирующим фактором служит дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Когда в растущую культуру клеток IIR добавляли очищенную ДНК пневмококка IIIS, этого оказывалось достаточно для того, чтобы у некоторых клеток типа IIR возникла способность синтезировать капсулярный полисахарид, характерный для клеток типа IIIS. Затем Эвери и его соавторы показали, что трансформирующий фактор может быть разрушен ферментами, расщепляющими ДНК (дезоксирибонуклеазами). Из этих экспериментов также следовало, что клетки типа IIR, полученные в результате вызванной ДНК трансформации из клеток IIIS, могут передавать приобретенную способность к биосинтезу определенного полисахарида своему потомству.

Таким образом, это новое свойство, полученное вместе с ДНК дру-

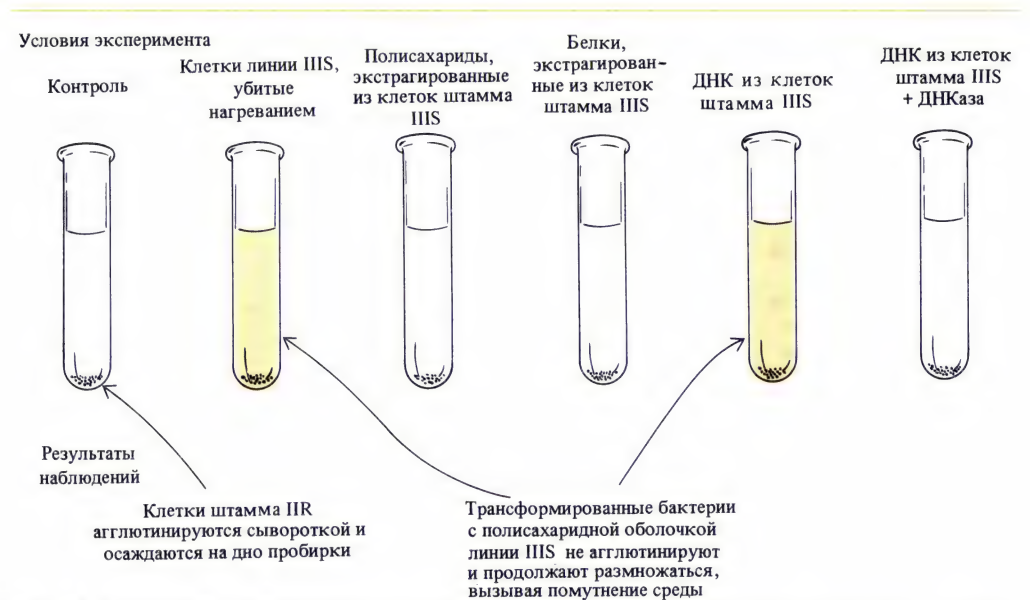


Рис. 4.4. Постановка эксперимента по определению природы трансформирующего агента. Активный фактор, содержащийся в убитых высокой температурой клетках IIIS, может быть выделен в чистом виде при фракционировании содержимого клетки. Оказалось, что трансформирующим фактором является вязкая нативная ДНК пневмококка.

гой линии клеток, становится наследственным свойством трансформированной клетки, как до того оно было наследственным свойством линии, из которой была получена ДНК. Следует подчеркнуть, что химический состав ДНК совершенно отличен от полисахарида, образующего слизистую оболочку, синтезируемую клетками линии IIIS; это означает, что трансформирующий фактор не является полисахаридом, влияющим на фенотипическое проявление слизистой оболочки. Эвери, Мак-Леод и Мак-Карти впервые показали, что наследственная способность клетки осуществлять определенную биосинтетическую функцию может передаваться другой клетке вместе с очищенной ДНК. Это открытие можно назвать выдающимся. В дальнейших исследованиях механизма трансформации было продемонстрировано, что фрагменты ДНК (в том числе содержащие ген, ответственный за синтез полисахарида) из убитых высокой температурой клеток попадают в R-клетки и посредством рекомбинации включаются в их ДНК (рис. 4.5).

Фундаментальное значение этого открытия, однако, не было вполне оценено сразу по трем причинам. Во-первых, знания о химической структуре ДНК были неполными и неправильно интерпретировались: считалось, что ДНК – соединение, химически недостаточно сложноорганизованное для того, чтобы содержать огромное количество информации, необходимой для управления развитием растений или животных. Во-вторых, многие ученые полагали, что химической основой генов служат белки, относительно которых было известно, что они устроены сложно. Наконец, изучение основ наследственности бактерий в 1944 г. только начиналось, и еще не было четко установлено, что бактерии

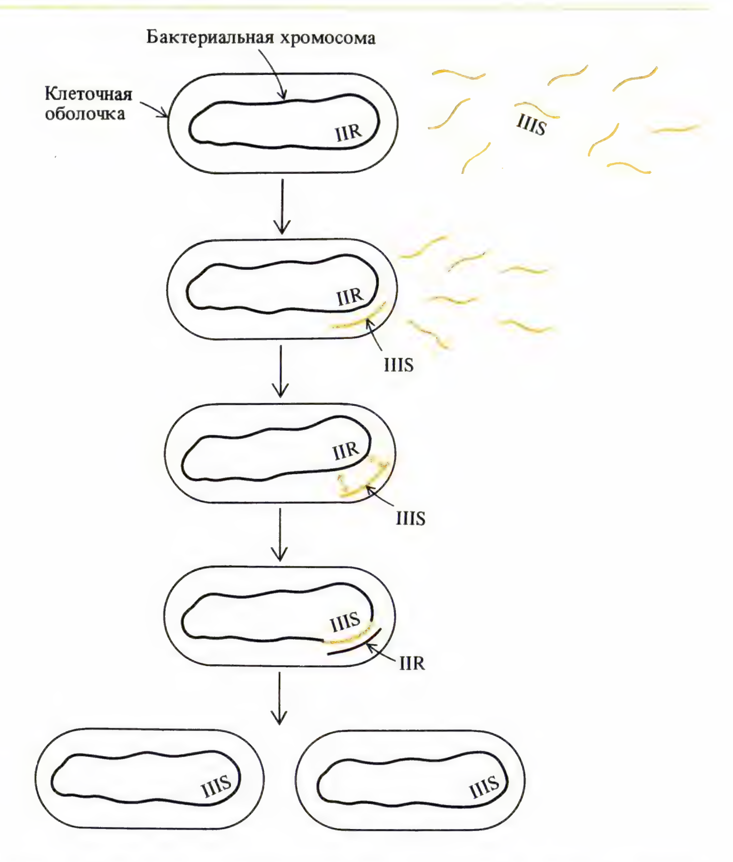


Рис. 4.5. Трансформация клеток IIR требует проникновения в эти клетки ДНК клеток типа IIIS и включения ДНК в хромосомы клеток IIR. Действие гена проявляется в синтезе клетками IIR полисахаридной оболочки, характерной для клеток типа IIIS. Этот ген передается потомству, составляя часть наследственной информации трансформированных клеток IIR.

обладают генами, во всех отношениях аналогичными генам, изучавшимся на высших организмах. Не было твердо установлено, что появление R-клеток и их обратное превращение в S-клетки происходит в результате мутаций. Может быть, ДНК и является наследственным веществом бактерий, но какое вещество играет ту же роль у высших организмов, для которых известно существование генов?

Нуклеиновые кислоты – наследственный материал вирусов

Генетические исследования бактериофагов начались много раньше, чем бактерий (отчасти вследствие проницательности Мёллера), и в 1952 г. удалось показать, что наследственным веществом фага T2 является ДНК. Это открытие было встречено с большим воодушевлением и привлекло внимание к работам, выполненным на пневмококках за несколько лет до этого. Бактериофаг T2 – один из наиболее тщательно исследованных фагов *E. coli*. Этот вирус содержит ДНК, заключенную в белковую оболочку. В 1952 г. Альфред Херши и Марта Чейз выяснили роль каждого из этих двух компонентов в формировании потомства фага.

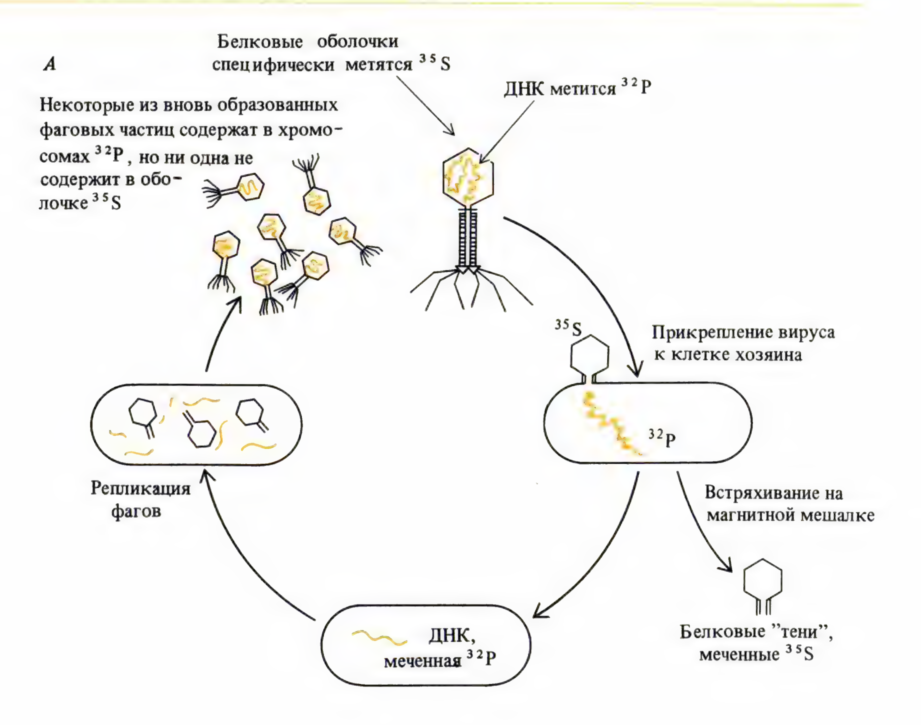
Лишь белковая составляющая Т2 содержит серу (в составе аминокислот метионина и цистеина). Фаг Т2 размножали на бактериях, культивируемых в среде с радиоактивным изотопом ^{35}S, в результате чего белок фага был помечен этим изотопом. По меньшей мере 99% всего фосфора в фаге Т2 приходится на ДНК, ее пометили радиоактивным изотопом ^{32}P. Эти радиоактивные метки позволяли проследить пути белка и ДНК фага Т2 при инфекции.

Инфекционный процесс начинается с прикрепления фага к бактериальной клетке (рис. 4.6). Этот этап можно наблюдать в электронный микроскоп; результаты наблюдений подтверждаются тем, что при центрифугировании клеток на данной стадии инфекции фаги, содержащие как ^{35}S, так и ^{32}P, осаждаются вместе с бактериями. Херши и Чейз обнаружили, что вскоре после инфицирования бóльшую часть меченного ^{35}S белка можно отделить от бактериальных клеток, активно перемешивая и встряхивая культуру на мешалке; однако бóльшая часть меченной ^{32}P ДНК не отделяется при этом от бактериальных клеток, поскольку, вероятно, оказывается в этом время уже внутри их. Устранение из культуры пустых белковых оболочек фага, так называемых «теней», не влияет на дальнейшие события: бактерии лизируются, и из них выходит потомство фага точно так же, как в том случае, когда тени остаются прикрепленными к клеткам (рис. 4.6). Из этого опыта Херши и Чейз сделали вывод, что для образования копий фага в зараженной бактериальной клетке существенна лишь ДНК родительского фага, хотя сами копии содержат как ДНК, так и белок. Таким образом, было высказано предположение, что белковый компонент фага лишь защищает ДНК от расщепляющих ферментов и обеспечивает попадание ДНК в бактериальную клетку, тогда как ДНК представляет собой собственно вещество наследственности.

Эксперимент Херши – Чейза свидетельствовал о важной генетической роли ДНК. Существуют две причины, по которым именно этот эксперимент был сразу признан в качестве решающего доказательства генетической роли ДНК, тогда как эксперименты Эвери, Мак-Леода и Мак-Карти по трансформации пневмококков не обратили на себя такого внимания. Во-первых, эксперимент был поставлен на бактериофаге, относительно которого было хорошо известно, что по характеру наследования признаков он аналогичен высшим организмам; на фаге Т2 было продемонстрировано существование мутаций и, так же как у высших организмов, описана рекомбинация мутантных генов. Во-вторых, проводившиеся между 1944 и 1952 годами химические исследования состава ДНК многих различных организмов опровергли широко распространенное ранее представление о ДНК как о простом полимере, в котором один тетрануклеотид многократно повторяется во всех молекулах. Эти исследования обнаружили, что ДНК обладает достаточной химической сложностью, чтобы служить веществом наследственности.

Опыты, проведенные на вирусе табачной мозаики (ВТМ), прямо показали, что белки вируса не играют генетической роли при заражении растений. Это послужило дополнительным аргументом в пользу того, что наследственным веществом вирусов служит нуклеиновая кислота, а не белковая составляющая. Подобно большинству вирусов растений, ВТМ (см. рис. 1.1) состоит из белка и рибонуклеиновой кислоты (РНК). РНК по химической структуре близка к ДНК, как мы увидим в следующем разделе. Каждая частица вируса содержит молекулу РНК, состоя-

7 – 1215



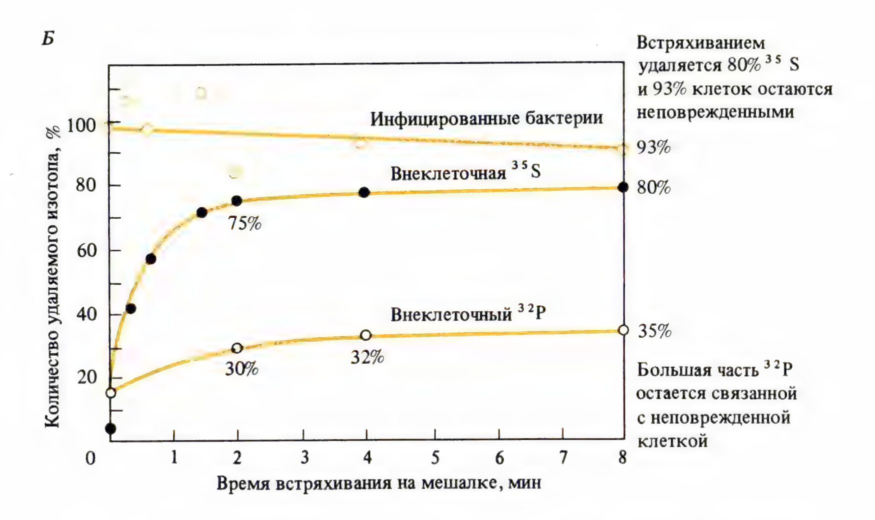


Рис. 4.6. *А*. Схема опыта Херши – Чейза, показавшего, что компонентом, ответственным за образование потомства фага Т2 в зараженной фагом клетке, является ДНК фага. *Б*. Судьбу ДНК фага Т2 можно проследить, измеряя радиоактивность. Изотоп фосфора ^{32}P, который служит меткой ДНК, остается связанным с зараженной клеткой, тогда как белок фага, меченный радиоактивной серой ^{35}S, может быть удален с поверхности инфицированной клетки; при этом инфекционный процесс не прервется.

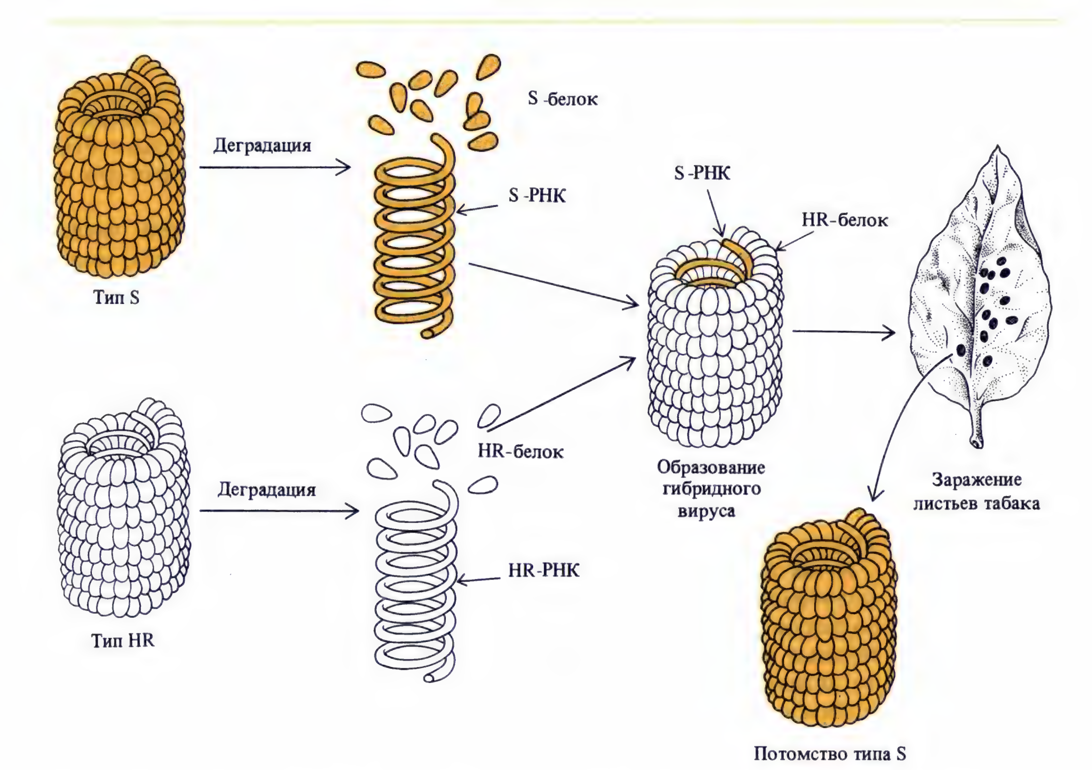


Рис. 4.7. Разделение (деградация) частиц вируса табачной мозаики на РНК и белковые субъединицы. Из РНК одного штамма и белковых субъединиц другого могут быть сконструированы гибридные вирусные частицы. При заражении растительных клеток гибридным фагом РНК и белок потомства гибридного фага полностью определяются его РНК. Особенности белка гибридного ВТМ не наследуются его потомством.

щую примерно из 6400 нуклеотидов, заключенную в белковую оболочку. Белковая оболочка состоит из примерно 2130 одинаковых субъединиц, каждая из которых представляет собой полипептидную цепь из 158 аминокислот, расположенных в определенной последовательности.

Существуют химические методы, позволяющие разделить РНК и белок вируса (рис. 4.7). Обычно очищенный препарат РНК ВТМ сохраняет не более 0,1% инфицирующей активности препарата интактного (неповрежденного) вируса. Однако при надлежащих условиях вирус можно в лабораторных условиях реконструировать из смеси очищенного белка. Субъединицы белка соединяются друг с другом и с РНК, образуя интактный вирус с нормальной способностью к инфекции.

Известно множество разновидностей ВТМ, отличающихся по кругу растений-хозяев и по вирулентности на различных растениях. Между ними существуют заметные различия и в аминокислотном составе белков. Например, в белковой оболочке ВТМ стандартного штамма отсутствуют гистидин и метионин, тогда как в вирусах штамма HR эти аминокислоты содержатся. Были проделаны эксперименты по реконструкции гибридных вирусов из очищенного белка HR и очищенной РНК стандартного штамма. Такие вирусы обладали нормальной инфекционностью. Когда же этими вирусами заражали растения, то состав белко-

вой оболочки потомства гибридных вирусов совпадал с составом белков штамма, из которого была взята РНК. Состав белковой оболочки гибридного вируса не наследовался; потомство таких вирусов имело белковые оболочки, состав которых определялся исключительно РНК. Оказалось, что лишь РНК обладает функциями, необходимыми для наследственной передачи этого признака (рис. 4.7).

Неопровержимым доказательством того, что носителем наследственных свойств вирусов служат именно нуклеиновые кислоты, можно считать демонстрацию инфекционных свойств очищенной нуклеиновой кислоты. Как уже указывалось, очищенная РНК ВТМ обладает слабой инфекционностью. Этот факт сначала объясняли тем, что в составе очищенного препарата РНК могло сохраниться некоторое количество интактных вирусов. Однако дальнейшие исследования показали, что инфекционность препаратов РНК ВТМ разрушается в результате обработки очищенным ферментом поджелудочной железы млекопитающих, называемым рибонуклеазой. Этот фермент гидролизует незащищенную РНК, но не влияет на инфекционность интактных частиц ВТМ. Пониженная способность к инфекции препаратов РНК ВТМ по сравнению с интактными вирусами объясняется отсутствием белковой оболочки, защищающей РНК от гидролиза. Рибонуклеазы растения разрушают бóльшую часть РНК до того, как они проникают в клетку. Однако тщательные исследования показали, что одна-единственная молекула РНК интактного вируса способна заразить растительную клетку и привести к образованию полноценных частиц ВТМ.

Впоследствии было показано, что очищенная ДНК некоторых фагов, из которых наиболее известны φX174 и λ, может заражать бактерии и в отсутствие белковой оболочки. Свободным молекулам ДНК нелегко проникнуть через клеточную стенку. Однако, обрабатывая бактерии *E. coli* определенным ферментом, а именно лизоцимом яичного белка, можно сделать их клеточную стенку проницаемой. Бактериальные клетки, стенки которых обработаны таким способом, называются *сферопластами* (из-за сферической формы, которую приобретают бактерии в результате такой обработки). Сферопласты не способны к нормальному росту, однако они могут быть инфицированы молекулами ДНК, выделенной из фагов φX174 и λ, и производить полноценные фаговые частицы. Такие эксперименты показывают, что именно ДНК, а не белок является наследственным материалом бактериофагов.

Таким образом, уже в результате первых исследований стало ясно, что именно нуклеиновые кислоты являются носителем наследственности во всех организмах. Два типа нуклеиновых кислот – ДНК и РНК – выполняют генетические функции во всех прокариотических и эукариотических клетках. Однако вирусы содержат лишь тот или иной тип нуклеиновых кислот.

Химический состав и строение нуклеиновых кислот

Основная структурная единица нуклеиновых кислот – *нуклеотид*. Нуклеотид состоит из трех химически различных частей, соединенных ковалентными связями (рис. 4.8). Первая часть – это содержащий пять атомов углерода сахар: дезоксирибоза в ДНК и рибоза в РНК. Вторая

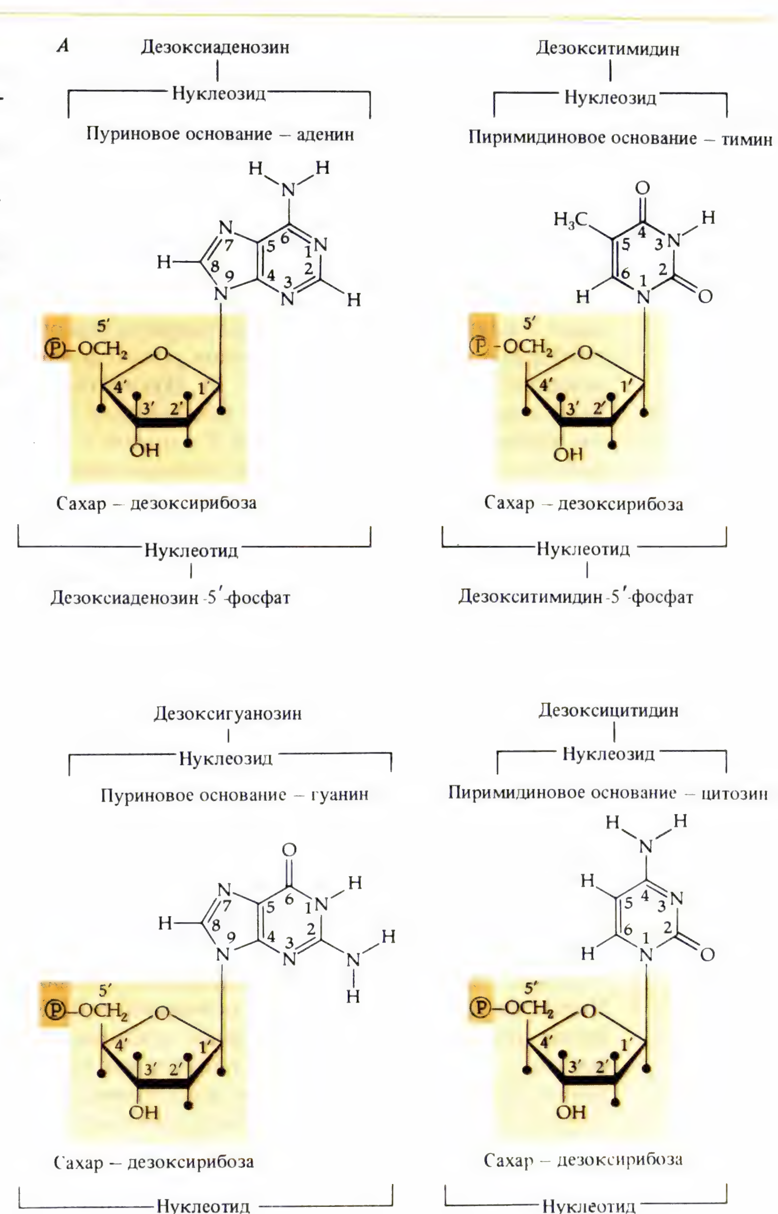
часть – пуриновое или пиримидиновое азотистое основание, ковалентно соединенное с первым атомом углерода сахара, оно формирует структуру, называемую нуклеозидом. ДНК содержит пуриновые основания – аденин (A) и гуанин (G) – и пиримидиновые основания – цитозин (C) и тимин (T); соответствующие нуклеозиды называются *дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезоксицитидин* и *дезокситимидин*. РНК содержит те же пуриновые основания, что и ДНК, а также пиримидин *цитозин*, но вместо тимина в ее состав входит урацил (U); соответствующие нуклеозиды называются *аденозин, гуанозин, цитидин* и *уридин*. Третью часть нуклеотида составляет фосфатная группа; фосфатные группы соединяют соседние нуклеозиды в полимерную цепочку посредством фосфодиэфирных связей между 5′-атомом углерода одного сахара и 3′-атомом углерода другого (рис. 4.8, *Б* и *В*). Нуклеотидами называются нуклеозиды с одной или несколькими фосфатными группами, присоединенными эфирными связями к 3′- или 5′-атомам углерода сахара. Синтез нуклеотидов предшествует синтезу нуклеиновых кислот, и соответственно нуклеотиды являются продуктами химического или ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты – это очень длинные полимерные цепочки, состоящие из мононуклеотидов, соединенных 5′–3′-фосфодиэфирными связями. Интактная молекула РНК содержит от 100 до 100000 и более нуклеотидов. Интактная молекула ДНК содержит в зависимости от вида организмов от нескольких тысяч до многих миллионов нуклеотидов. В те времена, когда Эвери, Мак-Леод и Мак-Карти ставили свои эксперименты на ДНК пневмококков, считалось, что структура молекул ДНК относительно проста и представляет собой определенную тетрануклеотидную последовательность, например $pApCpGpT_{OH}$, многократно повторенную, так что она образует полимер вида $(pApCpGpT)_n$. Таким образом, казалось, что ДНК не обладает сложностью, необходимой для того, чтобы служить веществом наследственности.

Последующие химические исследования Эдвина Чаргаффа по составу ДНК многих различных организмов убедили научную общественность в том, что ДНК в действительности обладает сложностью, необходимой для передачи наследственной информации. Исследования Чаргаффа показали, что состав оснований в ДНК различен у различных видов организмов. Это наблюдение исключило возможность того, что все молекулы ДНК состоят из одинаковых тетрануклеотидов. Исследования Чаргаффа выявили также одну замечательную особенность, присущую всем молекулам ДНК: молярное содержание аденина равно содержанию тимина, а молярное содержание гуанина – содержанию цитозина. Эти равенства называются правилами Чаргаффа: $[A] = [T]$, $[G] = [C]$; количество пуринов равно количеству пиримидинов. В зависимости от видовой принадлежности меняется лишь отношение $([A] + [T])/([G] + [C])$ (табл. 4.1).

Наблюдения Чаргаффа показали, что молекула ДНК может быть устроена много сложнее, чем предполагали до того, поскольку в соответствии с полученными им данными молекулы ДНК могли представлять собой самые различные последовательности оснований. Вскоре после работ Чаргаффа Уотсон и Крик фактически показали, что правила Чаргаффа не накладывают никаких ограничений на возможное число различных последовательностей оснований, которые могут образовывать молекулы ДНК.

Рис. 4.8. *А*. Нуклеотиды – это единицы, из которых построены нуклеиновые кислоты. Обратите внимание на нумерацию атомов углерода и азота в пуриновом и пиримидиновом кольцах. Атомы углерода сахара нумеруются отдельно с использованием штрихованных цифр. *Б* и *В*. Обратите внимание на сходство и различие полимеров ДНК и РНК.



5′-конец

Тимин

Аденин

Цитозин

Гуанин

3′-конец

Б
ДНК

5′-конец

Урацил

Аденин

Цитозин

Гуанин

3′-конец

В
РНК

Таблица 4.1. Состав оснований ДНК различных организмов

Организмы	Состав оснований (моль %)				Отношение оснований			Асимметрия
	A	G	C	T	A/T	G/C	Pu/Py	$\frac{A+T}{G+C}$
Животные								
Человек	30,9	19,9	19,8	29,4	1,05	1,00	1,04	1,52
Овца	29,3	21,4	21,0	28,3	1,03	1,02	1,03	1,36
Курица	28,8	20,5	21,5	29,2	1,02	0,95	0,97	1,38
Черепаха	29,7	22,0	21,3	27,9	1,05	1,03	1,00	1,31
Лосось	29,7	20,8	20,4	29,1	1,02	1,02	1,02	1,43
Морской краб	47,3	2,7	2,7	47,3	1,00	1,00	1,00	17,50
Морской еж	32,8	17,7	17,3	32,1	1,02	1,02	1,02	1,58
Саранча	29,3	20,5	20,7	29,3	1,00	1,00	1,00	1,41
Растения								
Зародыш пшеницы	27,3	22,7	22,8	27,1	1,01	1,00	1,00	1,19
Дрожжи	31,3	18,7	17,1	32,9	0,95	1,09	1,00	1,79
Гриб *Aspergillus niger*	25,0	25,1	25,0	24,9	1,00	1,00	1,00	1,00
Бактерии								
Escherichia coli	24,7	26,0	25,7	23,6	1,04	1,01	1,03	0,93
Staphylococcus aureus	30,8	21,0	19,0	29,2	1,05	1,11	1,07	1,50
Clostridium perfringens	36,9	14,0	12,8	36,3	1,01	1,09	1,04	2,70
Brucella abortus	21,0	29,0	28,9	21,1	1,00	1,00	1,00	0,72
Sarcina lutea	13,4	37,1	37,1	12,4	1,08	1,00	1,04	0,35
Бактериофаги								
T7	26,0	24,0	24,0	26,0	1,00	1,00	1,00	1,08
λ	21,3	28,6	27,2	22,9	0,92	1,05	1,00	0,79
φX174 (вирусная форма)	24,6	24,1	18,5	32,7	0,75	1,30	0.95	1,34
φX174 (репликативная форма)	26,3	22,3	22,3	26,4	1,00	1,00	1,00	1,18

По *Lehninger A. L.* (1975). Biochemistry, 2nd ed., Worth Publishers, New York.

Модель структуры ДНК Уотсона–Крика

В 1953 году Джеймс Уотсон и Френсис Крик предложили модель структуры ДНК, которая с тех пор многократно проверялась и признана правильной в целом и во многих деталях. Их модель основывалась на четырех группах данных (рис. 4.9):

1. ДНК представляет собой полимер, состоящий из нуклеотидов, соединенных 3′–5′-фосфодиэфирными связями.

2. Состав нуклеотидов в ДНК подчиняется правилам Чаргаффа.

3. Рентгенограммы волокон ДНК, впервые полученные Морисом Уилкинсом и Розалиндой Франклин, указывают на то, что молекулы обладают спиральной структурой и содержат более одной полинуклеотидной цепи.

4. Кислотно-щелочное титрование нативной ДНК показывает, что ее структура стабилизируется водородными связями. Титрование и нагревание нативной ДНК вызывают заметные изменения ее физических

Рис. 4.9. Наблюдения, использованные Уотсоном и Криком при построении модели структуры ДНК. *А.* Нуклеотиды связаны 3′–5′-фосфодиэфирными связями. *Б.* Правила Чаргаффа. *В.* Нагревание приводит к изменению физических свойств нативной ДНК, но не разрывает ковалентные связи (Prof. *Maurice H. F. Wilkins*, Kings College, London).

А

5′-конец

$O{=}P{-}O{-}CH_2$ (5′), O^- — Основание — O — 3′

O

$O{=}P{-}O{-}CH_2$ (5′), O^- — Основание — O — 3′

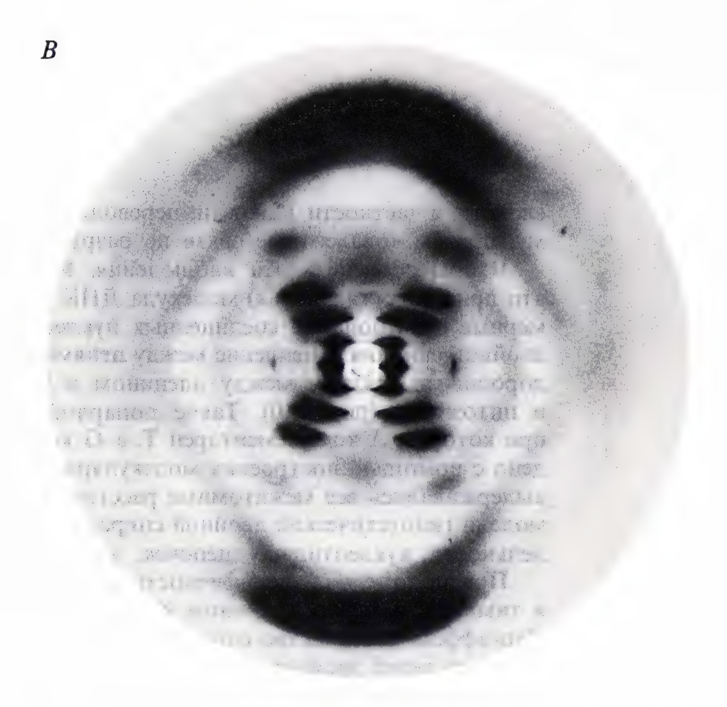
OH

3′-конец

Б

Молекулы А – с молекулами Т
Молекулы G – с молекулами С

В



Г Вязкий раствор ДНК $\xrightarrow[\text{или щелочь}]{\text{Нагревание}}$ невязкий раствор ДНК

Рис. 4.10. Пара оснований, связанных в ДНК водородной связью. Аденин образует пару с тимином посредством двух водородных связей, а гуанин связан с цитозином тремя водородными связями. Обратите внимание на то, что водородными связями соединяются пурины (аденин и гуанин) с пиримидинами (тимином и цитозином). Водородные связи много слабее ковалентных, соединяющих отдельные атомы каждого нуклеотида, но достаточно сильны для того, чтобы обеспечить специфичность образования пар A—T и G—C.

свойств, в частности вязкости, переводя ее в «денатурированную» форму, причем ковалентные связи не разрушаются.

Чтобы объяснить эти наблюдения, Уотсон и Крик предположили, что природная (нативная) молекула ДНК представляет собой две полимерные цепи попарно соединенных нуклеотидов, закрученные в форме двойной спирали. Сцепление между цепями обеспечивается особыми водородными связями между аденином и тимином и между гуанином и цитозином (рис. 4.10). Такое попарное сопоставление нуклеотидов, при котором A комплементарен T, а G комплементарен C, было выведено с помощью построения молекулярных моделей, на которых точно выдерживались все межатомные расстояния. Построение молекулярной модели гипотетической двойной спирали также потребовало антипараллельности нуклеотидных цепочек, как это изображено на рис. 4.11.

Предположенная специфичность водородных связей между аденином и тимином и между гуанином и цитозином объясняет наблюдавшееся Чаргаффом постоянство отношений A/T и G/C и отражает комплементарность цепей двойной спирали. Более того, для любой последовательности оснований возможна равная ей по длине комплементарная последовательность, составляющая вторую цепь двойной спирали. Конкретная последовательность пар A—T и G—C может быть видоспецифична и не влияет на структуру молекулы ДНК, образующую двойную спираль. Возможное число различных последовательностей пар оснований в молекуле ДНК практически бесконечно и способно кодировать колоссальное количество информации. Этот факт делает очень привлекательной гипотезу о том, что ДНК может служить веществом наследственно-

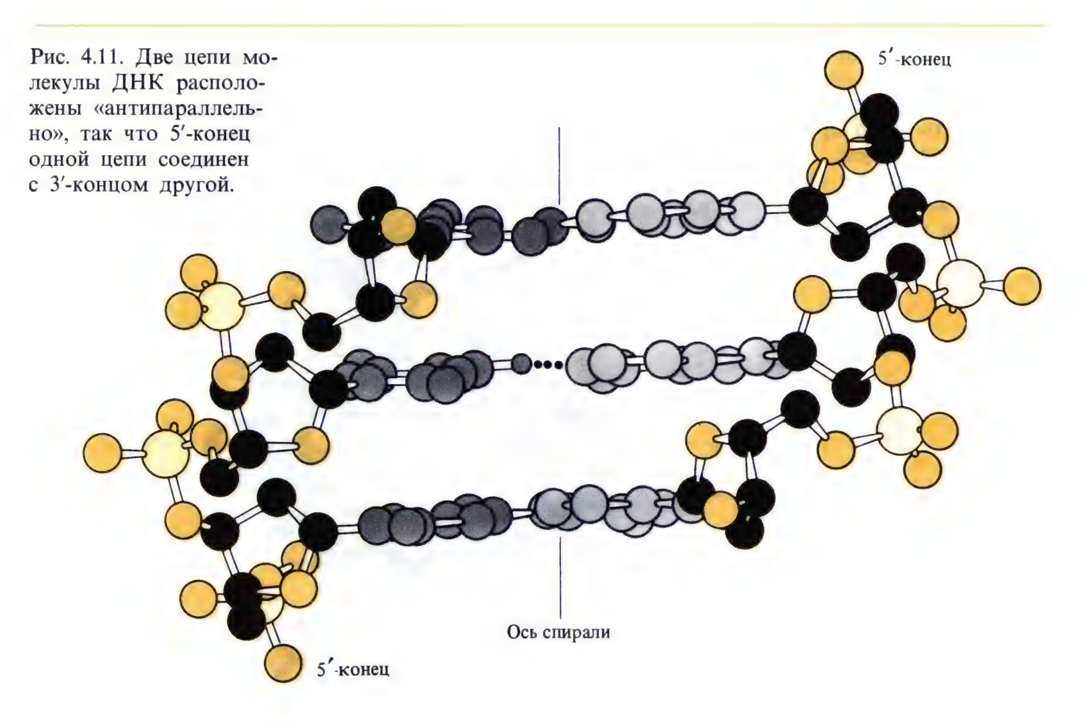


Рис. 4.11. Две цепи молекулы ДНК расположены «антипараллельно», так что 5′-конец одной цепи соединен с 3′-концом другой.

сти для всех организмов. Из модели также следует, что физическая структура нативной ДНК может сильно изменяться при нагревании или титровании, не нарушающих ковалентных связей, но разрывающих водородные связи, так что две цепи отделяются друг от друга. Пространственная и молекулярная модель предложенной Уотсоном и Криком двойной спирали ДНК изображена на рис. 4.12. Обратите внимание на то, что для разделения двух цепей им необходимо расплестись друг относительно друга.

Модель Уотсона – Крика позволяет представить себе, как может удваиваться нативная молекула ДНК, образуя две одинаковые дочерние молекулы. Поскольку две цепи ДНК комплементарны, каждая из них при расплетании двойной спирали может служить матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Последовательность оснований во вновь синтезируемой цепи будет определяться спецификой водородных связей между основаниями цепи-шаблона и вновь образуемой цепи (рис. 4.13). Таким образом, генетическая информация, содержавшаяся в последовательности пар оснований родительской молекулы, будет полностью воспроизведена в двух дочерних молекулах. Более того, если в процессе удвоения ДНК произошла ошибка и какой-то нуклеотид во вновь образуемой цепи выпал или оказался некомплементарным исходному, то это может изменить информационное содержание молекулы, причем можно ожидать, что эта ошибка будет передана дочерним молекулам ДНК в следующих поколениях. Такая замена пары нуклеотидов может обладать свойствами генетических мутаций. Таким образом, модель структуры ДНК Уотсона и Крика объясняет как способность генов к самоудвоению (репликации), так и их информационные свойства.

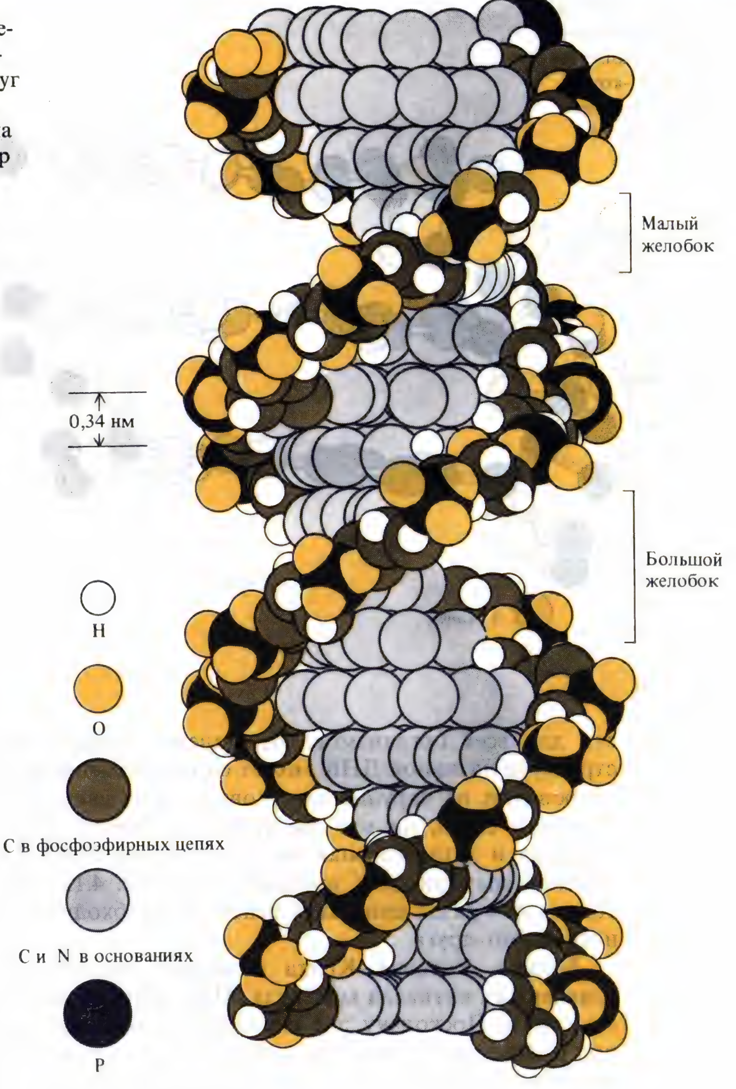


Рис. 4.12. Пространственная модель молекулы ДНК; видна закрученность цепей друг относительно друга. Обратите внимание на плотную упаковку пар оснований в двойной спирали.

Проверка модели Уотсона–Крика

Модель двойной спирали ДНК была предложена в 1953 г. и знаменовала рождение новой науки – молекулярной биологии. Однако прошло пять лет, прежде чем были получены первые убедительные экспериментальные подтверждения модели Уотсона–Крика в работах Мэтью Мезелсона и Франклина Сталя. В этих экспериментах было показано, что в точном соответствии с предсказаниями модели репликация ДНК происходит *полуконсервативно*: каждая дочерняя молекула ДНК состоит из одной интактной (консервативной) цепи, полученной от родительской

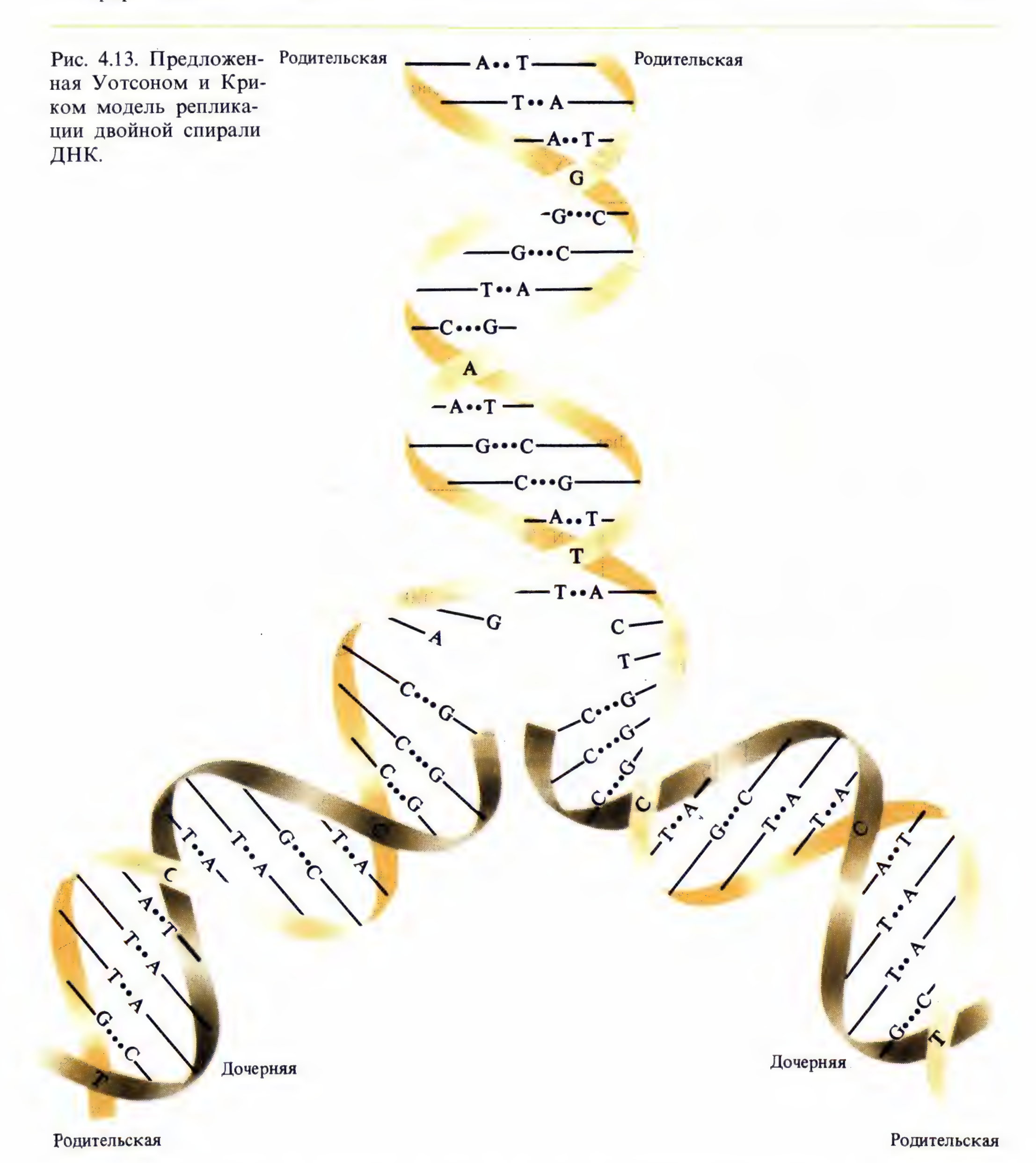


Рис. 4.13. Предложенная Уотсоном и Криком модель репликации двойной спирали ДНК.

двойной спирали, и одной вновь синтезированной цепи. С другой стороны, можно представить себе гипотетические механизмы репликации ДНК, которые не предсказываются моделью двойной спирали, а именно: 1) консервативный способ репликации, при котором родительская ДНК полностью сохраняется, а дочерние молекулы ДНК полностью синтезируются заново, и 2) дисперсный способ, при котором обе дочерние молекулы ДНК синтезируются заново, а родительская молекула распадается на нуклеотиды, которые могут входить или не входить в состав дочерних молекул.

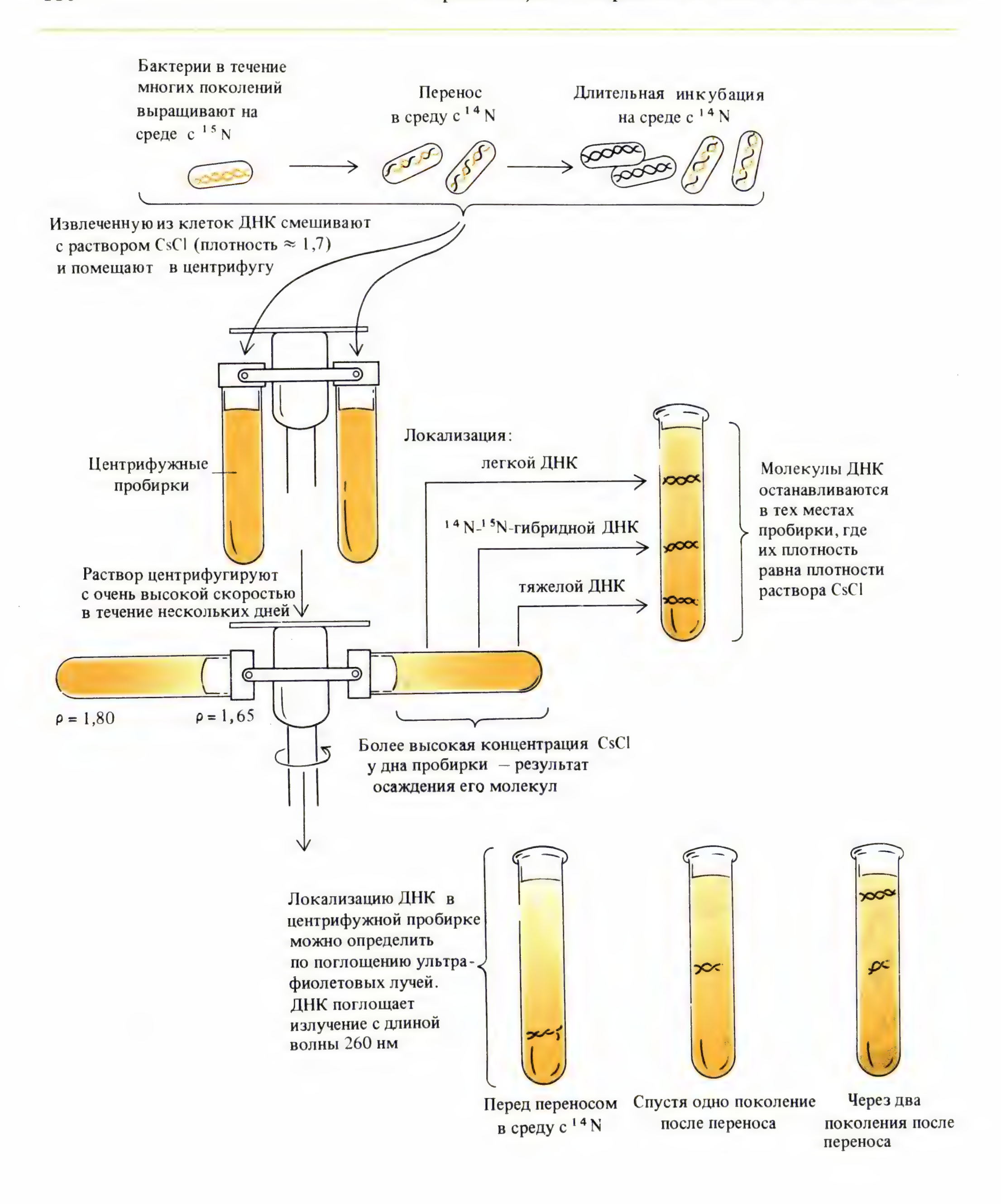


Рис. 4.14. Разделение молекул ДНК с различной плотностью посредством центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия. Схематически изображены последовательные этапы эксперимента Мезелсона и Сталя, показавшего полуконсервативный механизм репликации ДНК *E. coli*.

Чтобы определить, каким из этих способов реплицируется ДНК, надо уметь отличать дочерние молекулы от родительских. Мезелсон и Сталь выращивали *E. coli* на среде, содержащей в качестве источника азота ^{15}N. Тяжелый изотоп азота ^{15}N включался в состав ДНК и служил меткой. Для того чтобы пометить изотопом ^{15}N практически всю бактериальную ДНК, достаточно вести культивирование на такой среде в течение двенадцати поколений. Молекулы, содержащие ^{15}N, можно отличить от молекул, содержащих более легкий, обычный изотоп, по плотности, так как у ДНК с ^{15}N масса одного нуклеотида больше, чем у обычной ДНК. Молекулы ДНК с различной плотностью могут быть разделены центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия (рис. 4.14). В процессе центрифугирования молекулы ДНК собираются в том слое, в котором плотность раствора равна их собственной плотности. ДНК клеток *E. coli*, выращенных на среде, содержащей ^{15}N, имеет плотность 1,724 г/см^3, тогда как ДНК клеток, выращенных на обычной среде с изотопом ^{14}N, имеет плотность 1,710 г/см^3. Смесь этих двух типов ДНК легко разделяется при центрифугировании по плотности (рис. 4.14).

Аналогией, иллюстрирующей принцип центрифугирования в градиенте плотности, может служить погружение подводной лодки. Регулируя количество воды в балластных танках (баках), подводная лодка может зависать на желаемой глубине, плотность воды на которой равна средней плотности подводной лодки. Если набрать в танки больше воды, вытеснив соответствующее количество воздуха, то плотность подводной лодки увеличивается, и она погружается, попадая в слои более холодной воды с большей плотностью. Когда плотность воды оказывается равной плотности подводной лодки, лодка снова зависает на новой глубине.

В эксперименте Мезелсона и Сталя клетки, в течение многих поколений культивируемые на среде с ^{15}N, быстро переносили в среду, содержавшую ^{14}N. Через определенные промежутки времени отбирали пробы растущей культуры и в каждой из них определяли плотность ДНК. Результаты представлены на рис. 4.15. После первого деления на среде с ^{14}N плотность ДНК культуры была промежуточной между [^{15}N] ДНК и [^{14}N] ДНК. После второго деления на среде с ^{14}N половина клеток имела легкую ДНК, а вторая половина – ту же, что и в предыдущем поколении (промежуточную). После третьего деления на среде с ^{14}N 3/4 ДНК имело плотность, равную плотности [^{14}N] ДНК и 1/4 сохраняла промежуточную плотность. Соотношение между числом генераций и распределением плотности ДНК в точности соответствовало полуконсервативному типу репликации, предсказываемому моделью Уотсона – Крика (рис. 4.15).

Кроме того, модель предсказывала, что ДНК с промежуточной плотностью должна представлять собой гибридную двойную спираль, одна из цепей которой содержит только тяжелый изотоп азота (N^{15}), а другая – только легкий. Мезелсон и Сталь нагревали ДНК промежуточной плотности в течение 30 мин при температуре 100°C, что, как уже было известно, изменяет физические свойства молекулы, не разрывая ковалентных связей, и обнаружили, что она превращается в две равные по объему фракции ДНК с разными плотностями. Плотность одной из фракций, образовавшихся в результате нагревания, совпадала с плотностью тяжелой ДНК, а другой – с плотностью легкой ДНК (рис. 4.15).

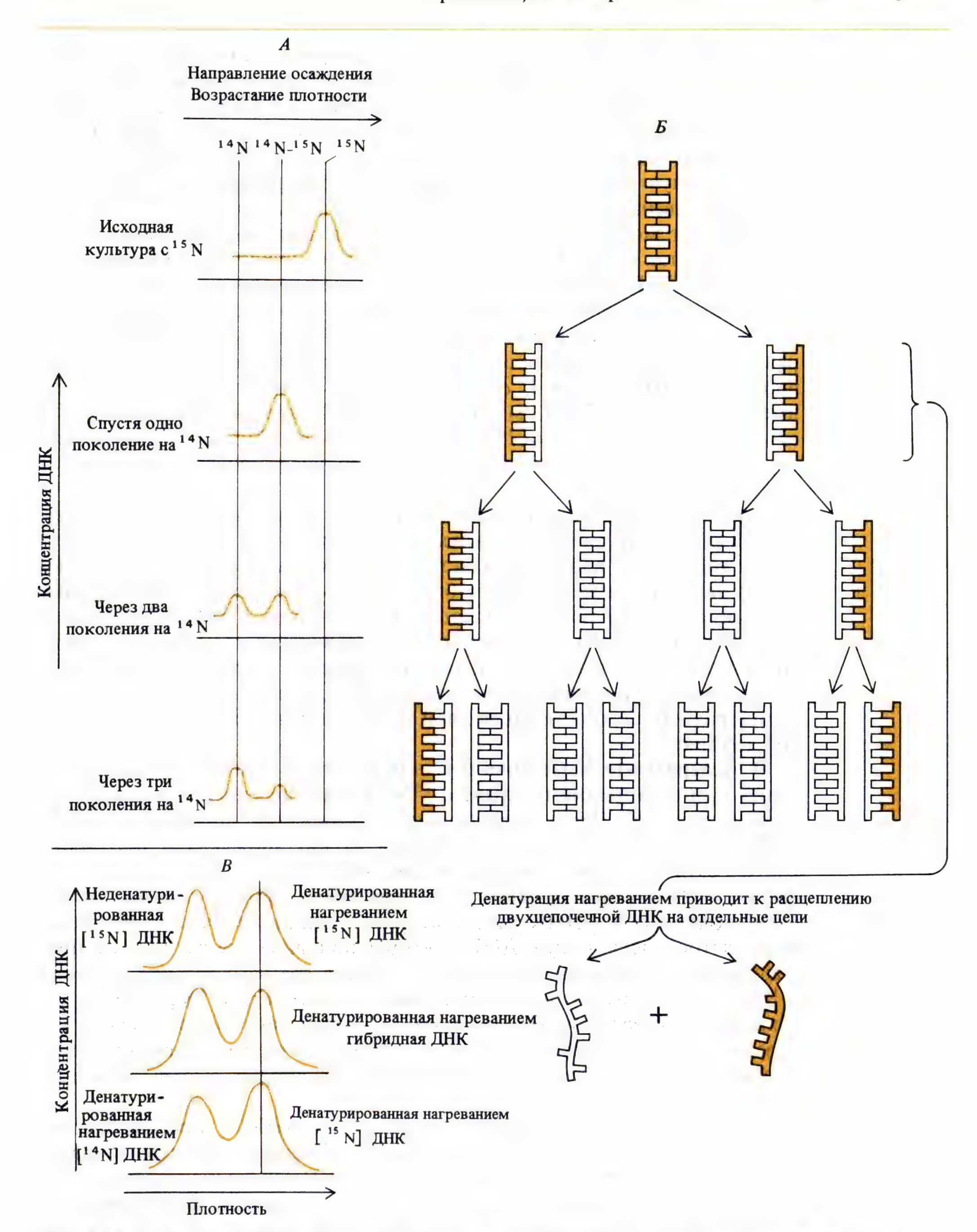


Рис. 4.15. *А*. Распределение плотности молекул ДНК, наблюдавшееся Мезелсоном и Сталем после перенесения растущих клеток *E. coli* из тяжелой среды в легкую. *Б*. Схематическая интерпретация результатов, представленных на *А*. ДНК, меченная ^{15}N, и вновь синтезируемая ДНК, имеющая ^{14}N, изображены разным цветом. *В*. Нагревание ДНК промежуточной плотности превращает ее в одноцепочечную ДНК, содержащую две фракции, плотность одной из которых совпадает с плотностью нагретой ДНК, меченной ^{15}N, а другой – меченной ^{14}N.

Из этого было сделано заключение, что ДНК промежуточной плотности, образующаяся после первого деления в легкой среде, представляет собой гибридную молекулу, состоящую из одной родительской цепи, содержащей только тяжелый изотоп азота, и другой, вновь синтезированной дочерней цепи, как это предсказывает модель Уотсона–Крика.

Аналогичные эксперименты проделывали с реплицирующейся ДНК множества различных прокариотических и эукариотических организмов, и каждый раз оказывалось, что ДНК реплицируется полуконсервативно. Эксперименты Мезелсона–Сталя были первым доказательством справедливости модели Уотсона–Крика. В настоящее время можно с уверенностью сказать, что основные положения этой модели убедительно подтверждены и структура двойной спирали легла в основу современной генетики.

Различные формы организации двухцепочечной ДНК

Пионерская работа Уилкинса и Франклин показала, что молекулы ДНК могут давать различную дифракционную картину в рентгеновских лучах в зависимости от содержания воды и солей. Модель, предложенная Уотсоном и Криком, соответствовала значениям параметров структуры, полученным на основе рентгенограммы так называемой B-формы ДНК, изображенной на рис. 4.9. Модель B-формы ДНК, представленная на рис. 4.12, характеризуется плоскопараллельным расположением пар нуклеотидных оснований внутри двойной спирали. Плоскости оснований почти перпендикулярны оси спирали и отстоят друг от друга на 3,4 Å. Этой повторяющейся единице соответствуют яркие меридиональные дуги в верхней и нижней частях рентгенограммы, изображенной на рис. 4.9. Диаметр спирали почти в точности равен 20 Å, а соседние пары нуклеотидных оснований повернуты друг относительно друга на 36°. В результате на один виток спирали приходится десять пар оснований. На рисунке изображена спираль с правым направлением вращения. Рентгенограмма ДНК, однако, не дает информации, достаточной для того, чтобы судить, является спираль правой или левой. При построении своей модели Уотсон и Крик выбрали направление вращения произвольно.

Все возможное разнообразие структур двухцепочечных молекул ДНК стало ясным относительно недавно в результате экспериментов по кристаллизации гомогенных двухцепочечных олигомеров ДНК, получаемых посредством химического синтеза. Дифракционные рентгеновские картины, полученные на таких кристаллах ДНК, более четки, чем получаемые на природной ДНК, и позволяют определить с большой точностью положения отдельных атомов. Эти исследования обнаружили, что как право-, так и левозакрученная двухцепочечная спираль ДНК может существовать в нескольких модификациях, характеризуемых различными значениями параметров (табл. 4.2). Тип спирали определяется свойствами растворителя и последовательностью нуклеотидов.

Самокомплементарный тетрамер ДНК типа CGCG (5′-конец всегда пишется слева) образует при кристаллизации левозакрученную двухцепочечную структуру, получившую название Z-ДНК из-за зигзагообразного характера фосфодиэфирного каркаса. Напротив, самокомплемен-

8–1215

Таблица 4.2. Структурные формы ДНК

	Форма			
	A	B	C	Z
Спираль	Правая	Правая	Правая	Левая
Число пар оснований в одном витке спирали	10,7	10,0	9,3	12
Угол между соседними парами оснований	+33,6	+36,0	+38,6	−30°
Расстояние между соседними парами оснований	2,3 Å	3,4 Å	3,0 Å	3,8 Å
Угол наклона оснований к оси спирали	+19°	−1,2°	−6°	−9°
Диаметр спирали (приблизительно)	23 Å	20 Å	19 Å	18 Å

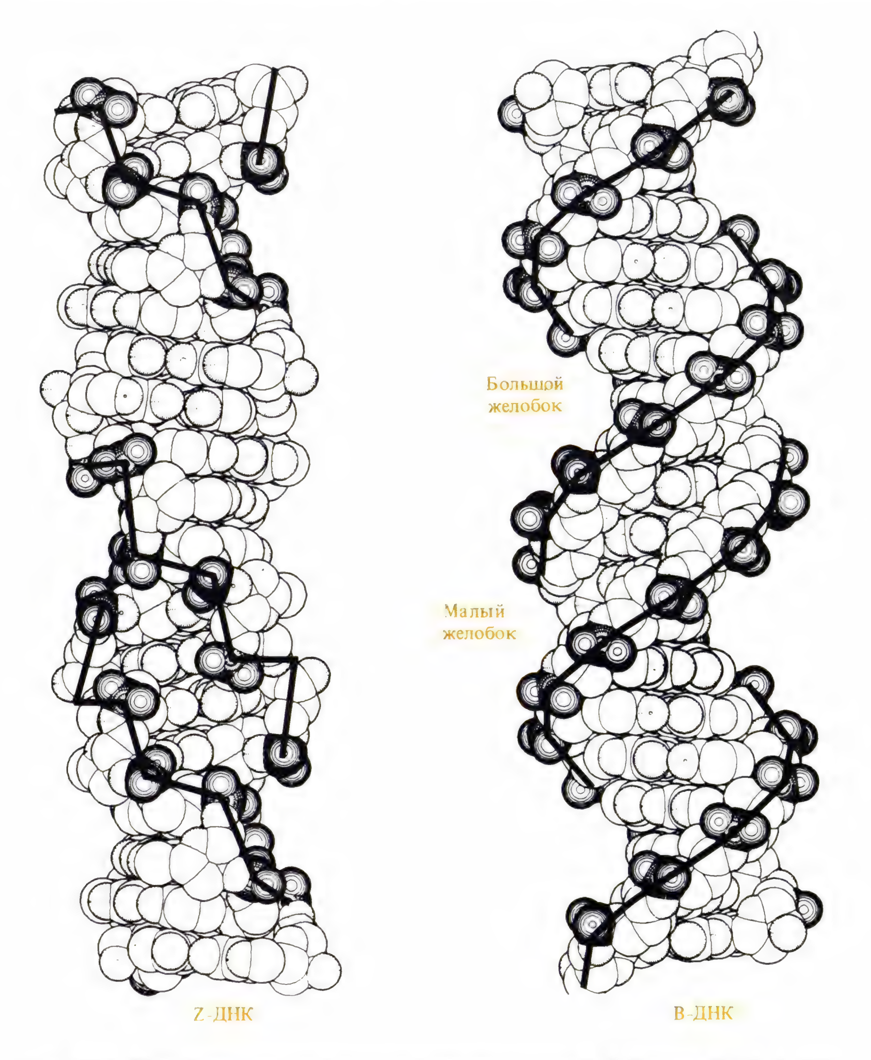


Рис. 4.16. Пространственные модели левозакрученной Z-формы ДНК и правозакрученной B-формы. (Prof. *Alexander Rich*, Massachusetts Institute of Technology.)





Рис. 4.17. Политенные хромосомы дрозофилы, обработанные флуоресцентными антителами, связывающимися с Z-ДНК. *А*. Поперечная исчерченность политенных хромосом на фотографии, сделанной в фазово-контрастном микроскопе. *Б*. Флуоресцентная микрофотография того же препарата, на которой светлые полосы указывают локализацию Z-ДНК. (Prof. *Alexander Rich*, Massachusetts Institute of Technology.)

тарный додекамер CGCGAATTCGCG кристаллизуется в форме правозакрученной двухцепочечной спирали В-формы, хотя этот додекамер содержит на обоих своих концах последовательность CGCG, которая сама по себе кристаллизуется в Z-форме. Эти две формы ДНК изображены для сравнения рядом на рис. 4.16.

Исследования структуры полимера $(CG)_n$ в растворе показали, что эта молекула может существовать в одной из двух альтернативных форм, а именно в правой В-форме или левой Z-форме. Эти две формы переходят друг в друга при изменении ионной силы раствора или катионов, нейтрализующих отрицательный заряд на фосфодиэфирном каркасе. Природные молекулы ДНК в основном существуют в правой В-форме, если они не содержат последовательностей типа $(GC)_n$. Однако если такие последовательности входят в состав ДНК, то эти участки при соответствующих условиях могут переходить в Z-форму. Возможность такого перехода указывает на то, что две цепи в двойной спирали ДНК находятся в динамическом состоянии и могут раскручиваться друг относительно друга, переходя из правой формы в левую и наоборот. Ясно, что молекулы ДНК для этого должны быть довольно лабильны и допускать конформационные превращения. Биологические следствия такой лабильности структуры ДНК пока не вполне понятны. Специфичные к Z-ДНК антитела реагируют с определенными участками гигантских хромосом клеток слюнных желез дрозофилы, что свидетельствует о том, что ДНК в хромосомах существует в обеих формах (рис. 4.17).

Организация ДНК в хромосомах

Молекулы ДНК в эукариотических хромосомах очень велики. Длина молекул ДНК, выделенных из клеток дрозофилы, достигает 1,2 см, и принято считать, что каждая эукариотическая хромосома содержит одну-единственную непрерывную молекулу ДНК. Упаковка таких огромных молекул в ядрах клеток является основной функцией гистонов, белков, характерных именно для эукариотических клеток.

Основная структурная единица эукариотической клетки – это *нуклеосома* (рис. 4.18). Нуклеосома содержит по две молекулы каждого из четырех гистонов, H2A, H2B, H3 и H4, соединенных в форме октамера. Каждый октамер связан с последовательностью из примерно 200 нуклеотидных пар длиной около 700 Å. Точное взаимное расположение

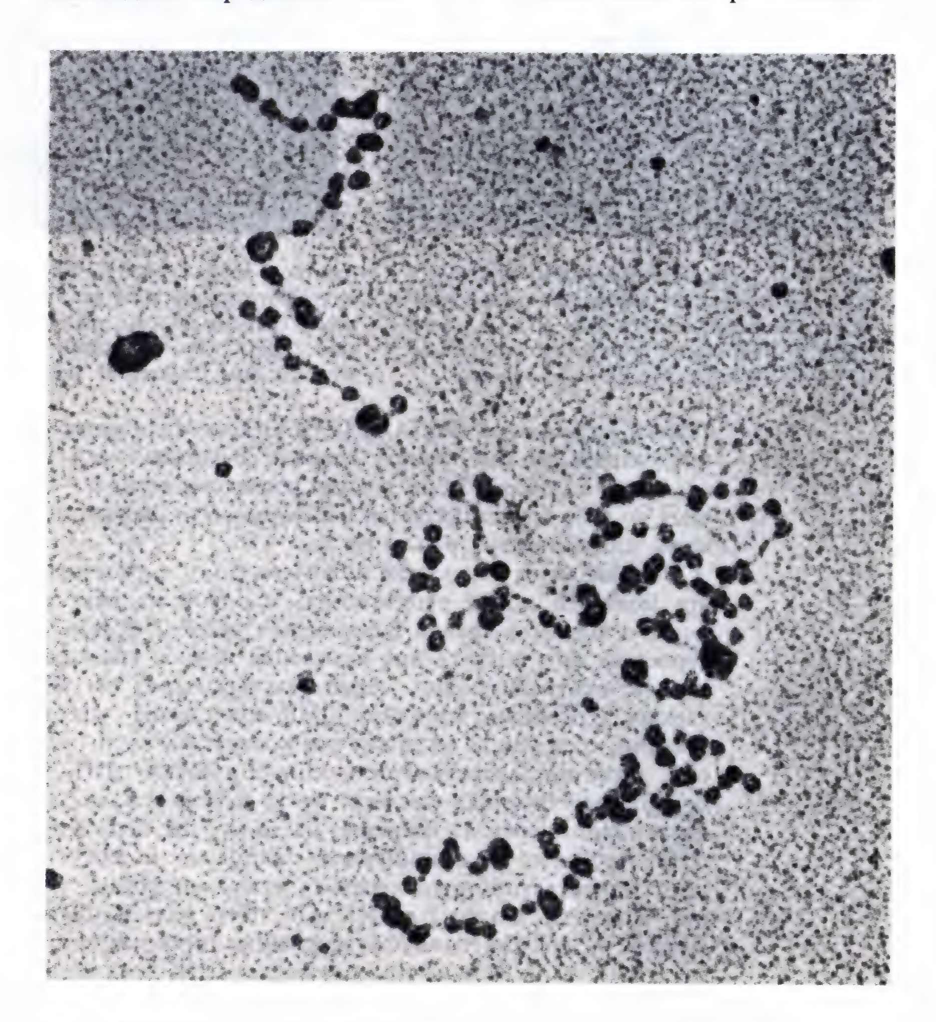
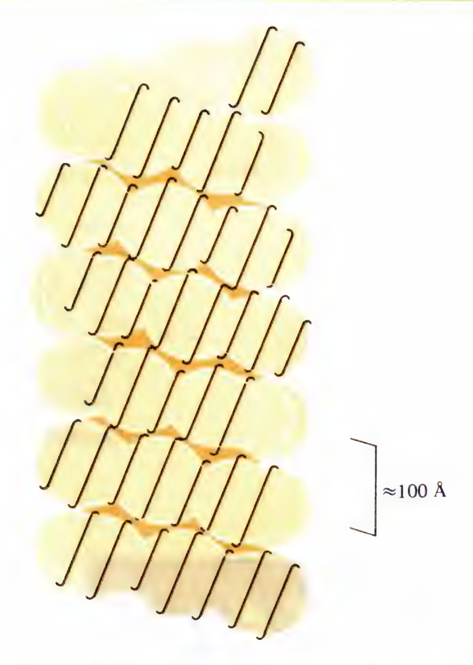


Рис. 4.18. Электронная микрофотография эукариотического хроматина, на которой видны нуклеосомы, соединенные тяжами со свободной ДНК. (Dr. *Jack D. Griffith*, University of North Carolina at Chapel Hill.)

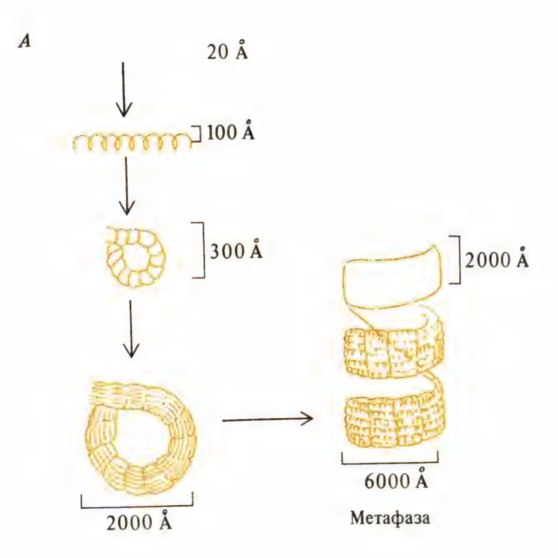
Рис. 4.19. Схематическое изображение участка соленоида; цепочка нуклеосом (сферы), каждая из которой обмотана ДНК, образует винтовую линию.



гистона и ДНК в нуклеосоме неизвестно, но считается, что ДНК каким-то образом наматывается на октамеры гистона. Нуклеосома имеет диаметр около 100 Å, и таким образом ДНК в нуклеосоме должна быть сложена примерно всемеро. Другой гистон, H1, обеспечивает связь между нуклеосомами, последовательность которых образует подобие винта (рис. 4.19). Диаметр этого винта (называемого *соленоидом*) составляет по одним оценкам около 300 Å, по другим – около 500 Å. Это различие, вероятно, обусловлено тем, что для приготовления электронно-микроскопических препаратов использовали разные методы. Если принять диаметр соленоида равным 300 Å, то упаковка последовательности нуклеосом в форме соленоида дает дополнительное уменьшение линейных размеров структуры в целом еще в 6 раз. В интерфазных хромосомах сам соленоид закручен винтом, образуя при этом полую трубку диаметром около 2000Å, что дает очередное сокращение линейных размеров содержащей ДНК структуры еще примерно в 18 раз (рис. 4.20).

Переход от интерфазной хромосомы к метафазной хроматиде, вероятно, связан с еще одним аналогичным закручиванием теперь уже трубки диаметром в 2000 Å в винтовую структуру диаметром около 6000 Å (рис. 4.20). Эта общая схема организации ДНК в ядрах клеток игнорирует различия в степени спирализации, которые почти наверняка существуют между теми участками хромосом, которые участвуют в синтезе РНК и репликации ДНК, и теми, которые в этих процессах не участвуют. Кроме того, гетерохроматиновые участки хромосом более компактны, чем эухроматиновые. В любом случае ДНК в ядрах эукариотических клеток образует иерархическую систему спиралей, основной единицей которой является нуклеосома.

Хромосомы прокариотических клеток представляют собой кольцевые молекулы ДНК; у *E. coli* длина кольца составляет 10^7 Å, т.е. около 1 мм. Эта огромной длины кольцевая нить помещается в клетке



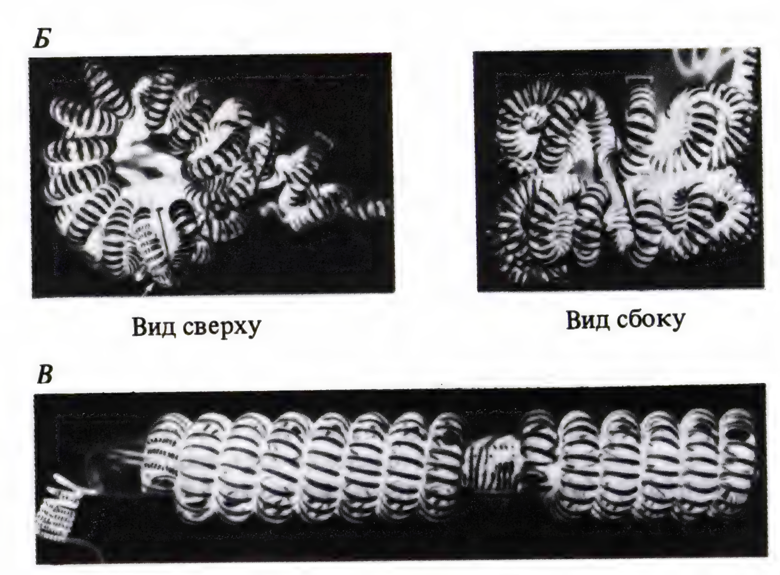


Рис. 4.20. Пространственные модели интерфазной и метафазной эукариотической хромосомы. *А*. Схематическое изображение винтовых структур, начиная от двойной спирали Уотсона – Крика диаметром 20 Å; далее нуклеосома – 100 Å, соленоид – 300 Å, трубка – 2000 Å и, наконец, метафазная хроматида – 6000 Å. *Б*. Пространственная модель двух последних уровней организации метафазной хроматиды, сделанная из проволоки. Тончайшие белые поперечные линии на проволоке (указаны белой стрелкой) представляют двойную спираль Уотсона – Крика диаметром 20 Å, белая черта указывает диаметр соленоида (300 Å), черная – диаметр трубки (2000 Å). *В*. Модель метафазной хромосомы в меньшем масштабе, чем на *Б* (черная черта по-прежнему обозначает 2000 Å). Тончайшие белые линии (слева) означают последовательность нуклеосом диаметром 100 Å, закрученную в соленоид диаметром 300 Å; последние уровни иерархии – трубка диаметром 2000 Å и хроматида – 6000 Å. Участок трубки диаметром 2000 Å в середине рисунка – это центромера, соединяющая два плеча метацентрической хромосомы. [*Sedat J.*, *Manuelidis L.* (1979). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **42**, 346.]

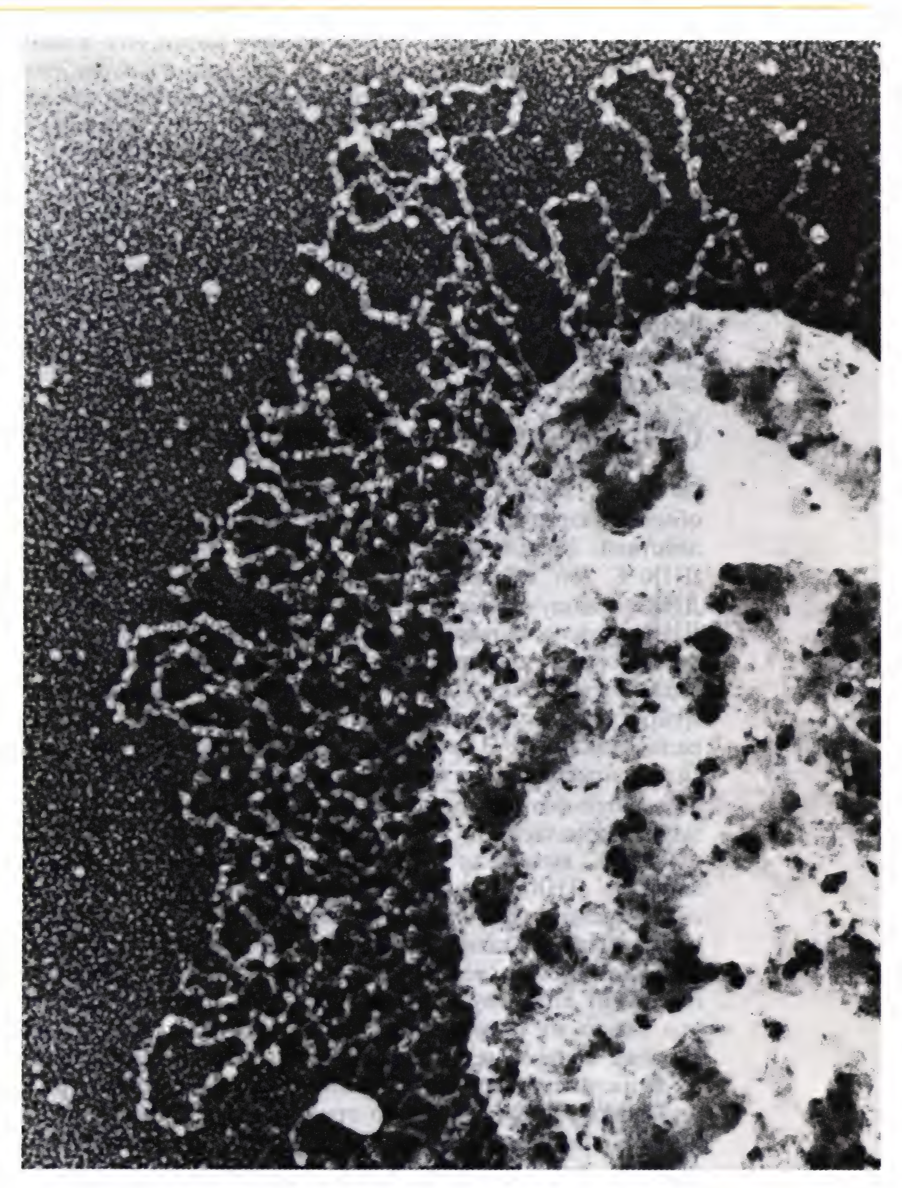


Рис. 4.21. Электронная микрофотография разрушенной клетки. Препарат приготовлен таким образом, что видны «бусы», образуемые соединением ДНК с белком. [*Griffith J. D.* (1976). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73,** 563.]

длиной лишь $2 \cdot 10^4$ Å при диаметре около $8 \cdot 10^3$ Å. Следовательно, ДНК может существовать в клетке лишь в высокоупорядоченном (конденсированном) состоянии. Хотя в прокариотических клетках нет белков гистонов, в них тем не менее содержатся некоторые белки, образующие комплексы с ДНК. При электронной микроскопии разрушенных определенным образом клеток *E. coli* можно видеть, что ДНК собрана в «бусины», по величине очень близкие нуклеосомам эукариот (рис. 4.21). Эти

бусины очень лабильны, что указывает на то, что взаимодействие между ДНК и белками в клетках *E. coli* много слабее, чем между ДНК и гистонами эукариот. Характер иерархической конденсации хромосомы *E. coli* не вполне понятен, но хромосома в целом может быть выделена в виде компактной структуры, называемой нуклеоидом.

Не вся ДНК эукариотических клеток находится в ядрах клеток. Митохондрии и недифференцированные хлоропласты растений, так называемые пластиды, представляют собой самореплицирующиеся органеллы и содержат собственные кольцевые молекулы ДНК. Эти молекулы очень невелики и кодируют ограниченное количество информации, необходимой для осуществления органеллами их функций. Так же как и хромосомы прокариот, они не связаны с гистонами и образуют внутри органелл нуклеоиды.

Общие особенности репликации ДНК

Нативные молекулы ДНК очень велики и при экстракции из клеток обычно разрываются в результате физических или ферментативных воздействий. Мезелсон и Сталь в своих экспериментах по репликации ДНК *E. coli* имели дело со сравнительно небольшими фрагментами ДНК, и полученные ими результаты относятся только к состоянию ДНК, предшествовавшему репликации и после нее. Полная репликация хромосомы *E. coli* впервые наблюдалась Джоном Кейрнсом. Он разработал метод очень мягкого разрушения клеток *E. coli.* В результате Кейрнсу удалось выделить интактные хромосомы *E. coli* и пометить их радиоактивным ^{3}H-тимидином. Меченые хромосомы аккуратно переносили из раствора на твердую поверхность, которая затем покрывалась в темноте фотографической эмульсией и в течение нескольких недель экспонировалась. В это время электроны, испускаемые радиоактивной ДНК, вызывали образование зерен серебра в фотоэмульсии вдоль молекул ДНК. Последующая обработка эмульсии дает *радиоавтограф* хромосомы, на котором цепочка зерен серебра отслеживает конформацию молекулы ДНК. Применение метода радиоавтографии привело прежде всего к установлению того факта, что ДНК *E. coli* имеет кольцевую форму (рис. 4.22). Впоследствии было показано, что такую же форму имеет ДНК всех прокариотических организмов, а также вирусов и органелл эукариотических организмов.

В настоящее время для молекул ДНК известны три основные конформации и соответственно три основных способа репликации. Кольцевые молекулы ДНК, например реплицирующаяся форма ДНК фага лямбда, могут реплицироваться способом, обнаруженным на радиоавтографах хромосом *E. coli.* Репликация кольцевой молекулы ДНК начинается в определенной точке кольца и приводит к образованию «вздутия», расширяющегося в двух направлениях вдоль хромосомы по мере репликации (рис. 4.22). Этот способ репликации ДНК ведет к образованию промежуточной структуры, напоминающей греческую букву θ. Тета-тип репликации превращает родительскую кольцевую хромосому в две дочерние кольцевые хромосомы, в каждой из которых сохраняется одна из цепей родительской молекулы ДНК, а вторая цепь заново синтезируется.

Как мы увидим в дальнейшем, жизненный цикл некоторых организмов требует превращения кольцевой хромосомы в линейную. Такое

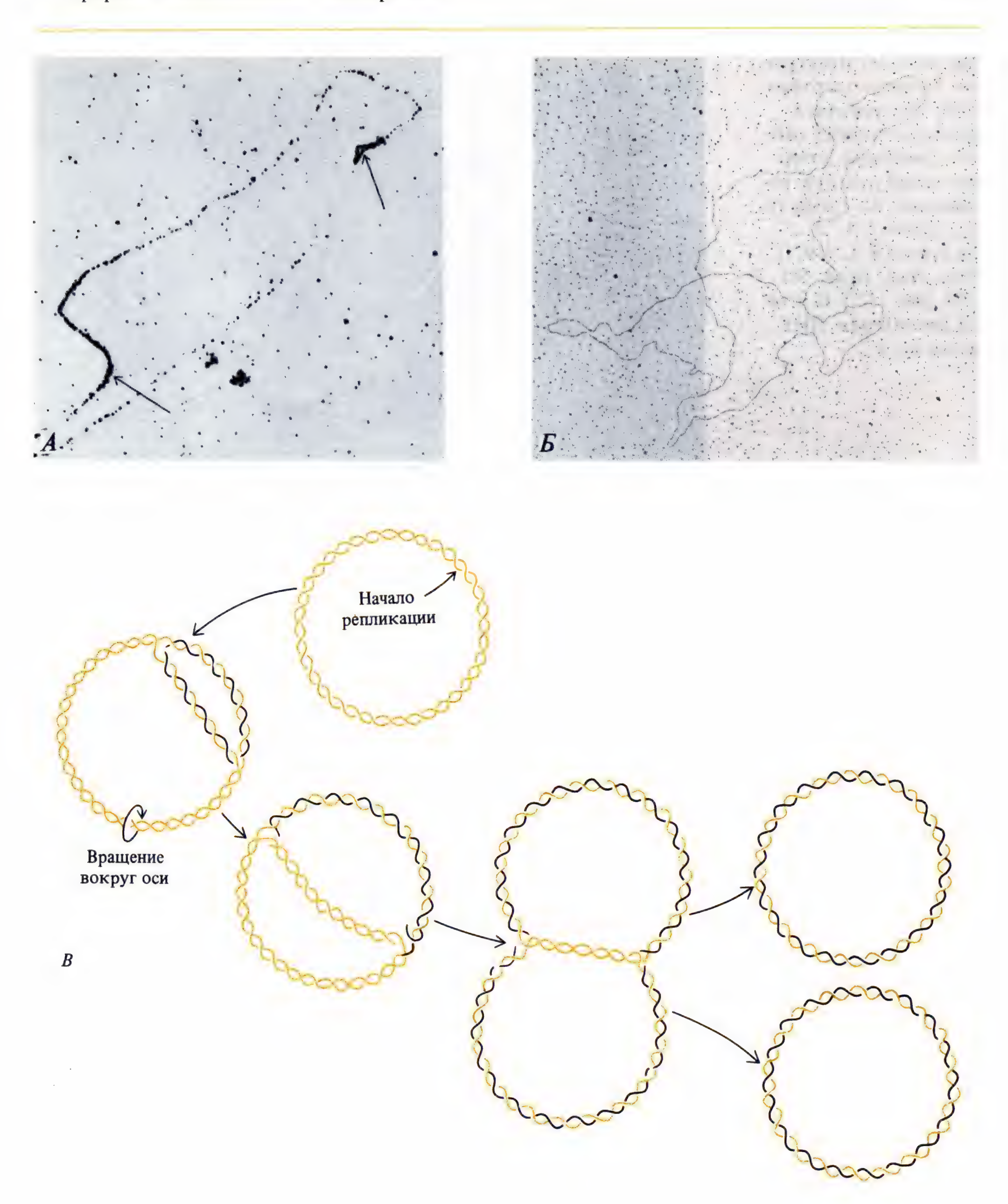


Рис. 4.22. *А*. Радиоавтограф целой хромосомы *E. coli*, меченной H^3-тимидином. В большую часть кольцевой хромосомы специфическая импульсная метка включается слабо. Участки с высокой специфической активностью указаны стрелками. Они соответствуют месту окончания репликации молекулы ДНК (слева внизу) и началу нового цикла репликации (сверху справа). [*Rodriguez R. L., Dalbey M. S., Davern C. I.* (1973). J. Mol. Biol., **74,** 599.] *Б*. Начало синтеза родительской ДНК при репликации бактериофага лямбда по тета-типу. (Dr. *David Dressler* and Dr. *John Wolsfson*, Harvard University.) *В*. Схема двунаправленной репликации кольцевой молекулы ДНК.



Рис. 4.23. *А*. Электронная микрофотография ДНК бактериофага лямбда в период синтеза линейной дочерней молекулы при репликации по сигма-типу. [*Kiger J. A., Jr., Sinsheimer R. L.* (1971). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 112.] *Б*. Схема репликации ДНК сигма-типа.

3′ 5′

5′

Специфическая нуклеаза отрезает сегменты определенной длины

5′

+

Разрез сшивается лигазой

3′

Специфичная эндонуклеаза разрезает одну из цепей

3′ 5′

3′

5′

3′

ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды к 3′-концу разомкнутой цепи, сдвигая 5′-конец

Комплементарные цепи синтезируются, и вновь возникает двойная спираль

Б



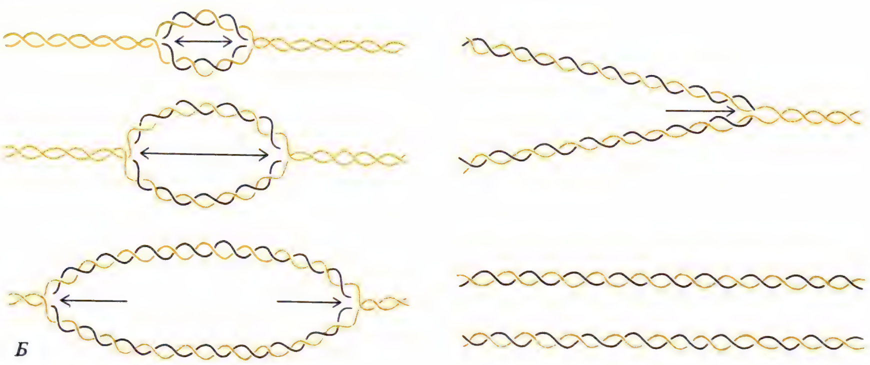


Рис. 4.24. *А*. Реплицирующаяся ДНК *Drosophila melanogaster*. Обратите внимание на множество «вздутий», соответствующих участкам репликации ДНК. Изображен фрагмент ДНК, состоящий из 119 000 пар нуклеотидов и включающий 23 вздутия (раздвоения). Масштабная черточка соответствует длине последовательности 5000 пар нуклеотидов. [*Kriegstein H.J., Hogness D.S.* (1974). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 135.] *Б*. Схема двунаправленной репликации линейной молекулы ДНК.

превращение происходит при другом типе репликации ДНК, известном под названием сигма-типа (от греческой буквы σ) или «катящегося кольца». Сигма-репликация начинается с разрыва фосфодиэфирной связи в одной из цепей родительской кольцевой молекулы, в результате чего по обе стороны разрыва образуются «голые» 3′-ОН- и 5′-PO_4-концы. Затем комплементарная кольцевая цепь служит матрицей для синтеза новой цепи, ковалентно прикрепленной к 3′-ОН-концу разорванной родительской цепи. По мере того как новая цепь наращивается на 3′-ОН-конце, 5′-PO_4-конец той же цепи смещается, образуя «хвост» кольца. Затем начинается синтез цепи, комплементарной этому хвосту (рис. 4.23). При таком способе репликации промежуточная структура имеет форму буквы «сигма». По мере продолжения репликации кольцевая родительская молекула превращается в две дочерние молекулы, одна из которых кольцевая, а другая – линейная. Сигма-репликация является необходимым этапом жизненного цикла некоторых бактериофагов, в частно-

сти лямбда и фХ174. Этот тип репликации имеет место при половой конъюгации бактерий и встречается в оогенезе некоторых эукариотических организмов.

Хромосомы некоторых вирусов и всех эукариотических организмов содержат линейные молекулы ДНК. Репликация линейных молекул начинается в определенных точках с образования репликационных вздутий. В небольших молекулах ДНК вирусов репликация может начинаться с одной точки. В больших молекулах ДНК, образующих хромосомы эукариот, иногда насчитываются сотни точек инициации репликации (рис. 4.24). После образования вздутия оно начинает увеличиваться по мере распространения процесса репликации ДНК в обоих направлениях от точки инициации. По ходу процесса соседние вздутия могут сливаться, а когда вздутие достигает конца молекулы, образуется характерная промежуточная Y-образная конфигурация. Когда репликация заканчивается, из одной линейной родительской молекулы образуются две линейные дочерние, каждая из которых, так же как и родительская, представляет собой двойную спираль.

Процесс репликации ДНК играет ключевую роль в передаче наследственной информации, записанной в последовательности пар оснований от родительской молекулы ДНК дочерним молекулам ДНК, от родительских соматических клеток – дочерним соматическим клеткам и, наконец, от родительского организма – потомкам.

Литература

Avery O. T., MacLeod C. M., McCarty M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types, J. Exp. Med., **79,** 137–158.

Cairns J. (1963). The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography, J. Mol. Biol., **6,** 208–213.

Dickerson R. E., Drew H. R., Conner B. N., Wing R. M., Fratini A. V., Kopka M. L. (1982). The anatomy of A-, B-, and Z-DNA, Science, **216,** 475–485.

Hershey A. D., Chase M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acidin growth of bacteriophage, J. Gen. Physiol., **36,** 39–56.

Kavenoff R., Zimm B. (1973). Chromosome-sized DNA molecules from *Drosophila*, Chromosoma, **41,** 1–27.

Meselson M., Stahl F. (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **44,** 671–682.

Nordheim A., Pardue M. L., Lafer E. M., Müller A., Stollar B. D., Rich A. (1981). Antibodies to left-handed Z-DNA bind to interband regions of *Drosophila* polytene chromosomes, Nature, **294,** 417–422.

Wang A. H.-J., Quigley G. J., Kolpak F. J., Crawford J. L., van Boom J. H., van der Marel G., Rich A. (1979). Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution, Nature, **282,** 680–686.

Watson J. D., Crick F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid, Nature, **171,** 737–738.

Watson J. D., Crick F. H. C. (1953). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid, Nature, **171,** 964–967.

Wilkins M. H. F. et al. (1953). Molecular structure of deoxypentose nucleic acids, Nature, **171,** 738–740.

Chromatin, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology XLII, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1978.

Chromosome Structure and Function, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology XXXVIII, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1973.

Ключевые слова и понятия

Ауксотроф
Водородная связь
Гистон
Двойная спираль
ДНК
Колония
Негативная колония (бляшка)
Нуклеозид
Нуклеоид
Нуклеосома
Нуклеотид
Основание
Полуконсервативная репликация
Правило Чаргаффа
Прототроф
Радиоавтография
Репликация сигма-типа
Репликация тета-типа
РНК
Трансформация
Фосфодиэфирная связь
Эксперимент Мезельсона – Сталя
Эксперимент Херши – Чейза
B-форма ДНК
Z-форма ДНК

Задачи

4.1. Суспензию бактерий последовательно разводят 1/100, 1/100 и 1/50, по 0,2 мл суспензии из последнего разведения высевают на поверхность трех чашек Петри с агаризованной средой. После инкубации на этих чашках появилось 105, 84 и 98 бактериальных колоний. Какова была примерная концентрация бактерий в исходной культуре?

Ту же исходную культуру, разведенную последовательно 1/100, 1/100, 1/10, наносят по 0,2 мл на поверхность трех чашек Петри, засеянных фагом T2. На чашках выросло 40, 25 и 30 колоний. Какова частота возникновения устойчивых к фагу T2 бактерий в исходной культуре?

4.2. Каковы были бы результаты экспериментов Мезельсона и Сталя, если бы ДНК реплицировалась консервативно? А если дисперсно?

4.3. Некоторые ДНК-фаги, например фX174, содержат одну кольцевую молекулу ДНК. Каков, по вашему мнению, механизм репликации их генома? Выделенная из фага ДНК способна заражать сферопласты *E. coli*; однако разрыв даже одной фосфодиэфирной связи в ДНК дезоксирибонуклеазой (фермент, расщепляющий такие связи) лишает молекулу ДНК инфекционности. Молекулы ДНК того же фага, выделенные из инфицированных клеток, намного устойчивее к дезоксирибонуклеазе. Почему?

4.4. Синтетический полимер dA/dT (d обозначает дезоксирибозу) – это двухцепочечная молекула, у которой одна цепь – poly-dA, а вторая – poly-dT; он характеризуется определенной *температурой плавления* (T_m). Это температура, при которой половина нуклеотидов существует в двухцепочечной форме, а половина – в одноцепочечной. Температура плавления poly-dA/dT ниже, чем poly-dG/dC. Как вы думаете, почему? Воспользовавшись данными, приведенными в табл. 4.1, оцените относительные значения T_m для ДНК человека, *E. coli* и *Sarcina lutea*.

4.5. В районе исследовательской станции Южного полюса упал метеорит типа угольного хондрита. С его поверхности выделены вирус, названный Z1, и его хозяин. Продумайте постановку эксперимента, позволяющего определить, что является наследственным веществом Z1,



Рис. 4.25. Результаты эксперимента Мезелсона – Сталя

белок или ДНК. Продумайте возможные результаты эксперимента в обоих случаях.

4.6. Установлено, что наследственным веществом вируса Z1 и его хозяина является ДНК. Для определения способа репликации ДНК клеток хозяина был поставлен эксперимент типа Мезелсона – Сталя. Результаты эксперимента представлены на рис. 4.25. Каков способ репликации?

5

Геном эукариот

Ген – это функциональная единица, часть молекулы ДНК. Полное описание структуры и организации генов какого-либо организма подразумевает описание последовательности нуклеотидов в ДНК этого организма. Однако описание полной последовательности нуклеотидов в молекулах ДНК даже мельчайших вирусов составляет колоссальную проблему, практически неразрешимую для молекул ДНК высших организмов. Действительно, существующее у всех видов организмов генетическое разнообразие свидетельствует о том, что ни одна последовательность нуклеотидов в геноме не является уникальной и инвариантной для всех особей вида. Геном *E. coli* состоит примерно из $3{,}2 \cdot 10^6$ нуклеотидных пар (н. п.). Ясно, что даже для такого небольшого генома, как *E. coli*, возможно огромное количество различных нуклеотидных последовательностей. Для каждой нуклеотидной пары существуют четыре возможности (AT, TA, GC, CG), и, следовательно, число возможных нуклеотидных последовательностей в генотипе *E. coli* составляет $4^{3,2 \cdot 10^6} = 10^{1,93 \cdot 10^6}$. Число возможных последовательностей в молекуле ДНК человека, очевидно, много больше этого огромного числа. Содержание ДНК в гаплоидном геноме некоторых эукариотических организмов представлено на рис. 5.1. Числа на шкале показывают, во сколько раз количество ДНК превышает количество ДНК в геноме *E. coli.*

Из сказанного выше становится ясно, почему бóльшая часть современных знаний о генетической организации ДНК основана на *генетическом анализе*, а не на химическом анализе последовательностей нуклеотидов в ДНК. Генетический анализ позволяет составлять подробные модели (карты) генетической организации хромосом. Для многих организмов оказалось возможным очень точное сопоставление таких гене-

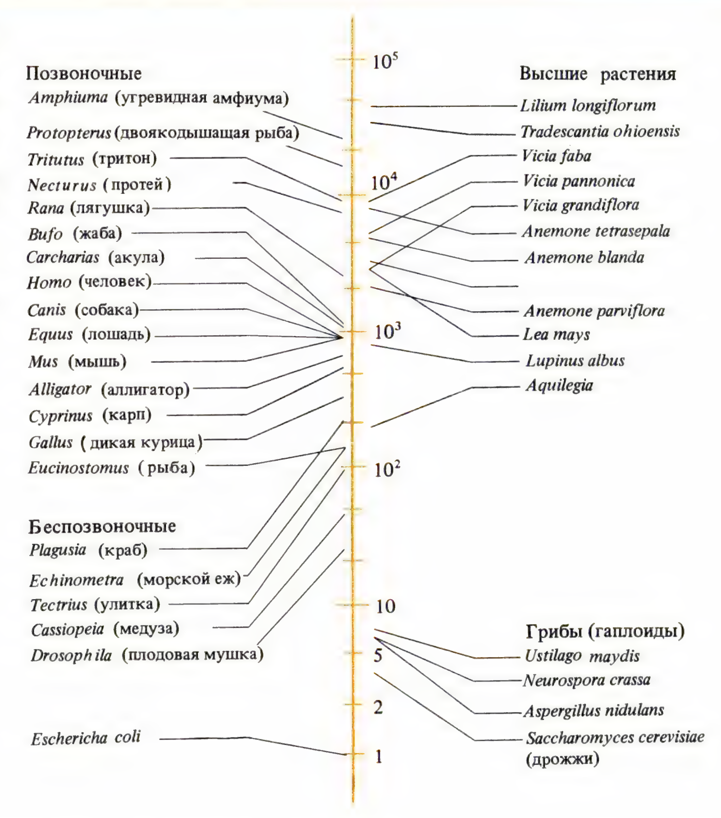


Рис. 5.1. Относительное количество ДНК в гаплоидном наборе клеток различных организмов. За единицу принято содержание ДНК в геноме *E. coli* ($3{,}2 \cdot 10^6$ нуклеотидных пар). (*J. D. Watson*, Molecular Biology of the Gene, 3rd ed., W. A. Benjamin, Menlo Park, Calif., 1976.)

тических карт с физической организацией ДНК в соответствующих хромосомах. Основы такого генетического анализа были заложены Менделем (гл. 2). Наблюдавшееся Менделем независимое распределение аллелей отвечает расположению соответствующих генов в разных хромосомах и, следовательно, в разных молекулах ДНК. В этой главе описывается применение генетического анализа к изучению генетической организации ДНК отдельных хромосом.

Методы генетического анализа развивались применительно к генетике диплоидных эукариотических организмов. Поскольку эти методы разработаны исходно для организмов, жизненный цикл которых включает мейоз, то именно для таких организмов они и излагаются в этой главе. В последующих главах мы увидим, как методология анализа используется при изучении генетической организации бактерий и вирусов, у которых мейоза нет.

Для того чтобы достичь максимального понимания генетической организации, генетики сосредоточили свое внимание на изучении сравнительно небольшого числа организмов, наиболее удобных для генетического анализа. Из эукариотических организмов в качестве объекта была выбрана плодовая мушка *Drosophila melanogaster*. Среди бактерий таким организмом послужила *E. coli*, а среди вирусов – бактериофаги T2, -T4, лямбда и фX174. Изучение этих геномов послужило парадигмой при изучении генетической организации других организмов.

Дополнение 5.1. Линии, гомозиготные по двум рецессивным мутациям

В природе линии, гомозиготные по двум рецессивным мутациям, почти не встречаются: генетики вынуждены специально конструировать их для постановки анализирующих скрещиваний. Используемый для этого метод схематически изображен на рис. 5.2: дигомозиготные особи возникают в результате рекомбинации в поколении F_2 от скрещивания особей, гомозиготных по разным рецессивным мутациям.

Скрещивание (P) $\frac{a\ b^+}{a\ b^+} \times \frac{a^+ b}{a^+ b}$

Первое поколение (F_1) $\frac{a\ b^+}{a^+ b} \times \frac{a\ b^+}{a^+ b}$

♀ гаметы \ ♂ гаметы	$a\ b^+$	$a^+ b$	$a^+ b^+$	$a\ b$
$a\ b^+$	$\frac{a\ b^+}{a\ b^+}$	$\frac{a\ b^+}{a^+ b}$	$\frac{a\ b^+}{a^+ b^+}$	$\frac{a\ b^+}{a\ b}$
$a^+ b$	$\frac{a^+ b}{a\ b^+}$	$\frac{a^+ b}{a^+ b}$	$\frac{a^+ b}{a^+ b^+}$	$\frac{a^+ b}{a\ b}$
$a^+ b^+$	$\frac{a^+ b^+}{a\ b^+}$	$\frac{a^+ b^+}{a^+ b}$	$\frac{a^+ b^+}{a^+ b^+}$	$\frac{a^+ b^+}{a\ b}$
$a\ b$	$\frac{a\ b}{a\ b^+}$	$\frac{a\ b}{a^+ b}$	$\frac{a\ b}{a^+ b^+}$	$\frac{a\ b}{a\ b}$

Второе поколение (F_2)

Рис. 5.2. Генотипы потомства в поколении F_2 полученном от скрещивания двух линий, каждая из которых гомозиготна по одному рецессивному гену. Гомозигота по двум рецессивным аллелям представлена в правом нижнем углу.

Рекомбинация сцепленных генов

Объединение множества генов в одной хромосоме определяет характер наследования признаков, контролируемых этими генами. Гены, находящиеся в одной хромосоме, часто не расходятся независимо и потому представляют собой второе исключение из законов Менделя (первым было рассмотренное нами ранее наследование, сцепленное с полом). Гены, характер наследования которых отличается от независимого расщепления, называются *сцепленными*.

Во второй главе мы видели, что Мендель постулировал два возможных исхода скрещивания двух чистых линий гороха, одна из которых имеет гладкие желтые семена (*RRYY*), а другая – морщинистые и зеленые (*rryy*). Если при формировании гамет в поколении F_1 распределение аллелей независимо, то следует ожидать возникновения в равных долях четырех типов гамет (*RY*,*Ry*,*rY* и *ry*), что ведет к появлению в поколении четырех фенотипов в отношении 9 : 3 : 3 : 1. Если же аллели каждого родителя оставались при формировании гамет в поколении F_1 вместе, то возникли бы лишь два типа гамет: *RY* и *ry*. Другими словами, гены, определяющие форму семян и их цвет, были бы полностью сцеплены. Результат такого полного сцепления проявлялся бы в поколении F_2. Оно было бы представлено лишь растениями двух типов с гладкими желтыми семенами и с морщинистыми зелеными в отношении 3 : 1. Если бы эти гены были полностью сцеплены, то каждая

Рис. 5.3. Генотипы потомства от анализирующего скрещивания по двум генетическим локусам. Выписанные справа числа означают долю (в %) соответствующего генотипа в потомстве, если 1) локусы *a* и *b* расходятся в мейозе независимо и 2) если они полностью сцеплены.

Родительское скрещивание $\frac{a^+b^+}{a^+b^+} \times \frac{a\ b}{a\ b}$

Анализирующее скрещивание $\frac{a^+b^+}{a\ b} \times \frac{a\ b}{a\ b}$

				Ожидаемое количество (%)
(1) Независимое расщепление	Типы потомства	$\frac{a^+b^+}{a\ b}$	Родительские типы	25
		$\frac{a\ b}{a\ b}$		25
		$\frac{a^+b}{a\ b}$	Рекомбинантные типы	25
		$\frac{a\ b^+}{a\ b}$		25
(2) Полное сцепление	Типы потомства	$\frac{a^+b^+}{a\ b}$	Родительские типы	50
		$\frac{a\ b}{a\ b}$		50
		$\frac{a^+b}{a\ b}$	Рекомбинантные типы	0
		$\frac{a\ b^+}{a\ b}$		0

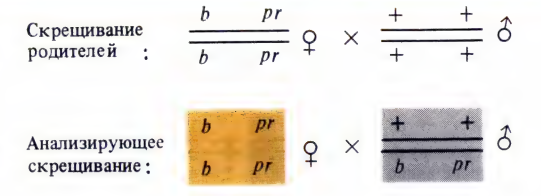
пара признаков (гладкие и желтые, а также морщинистые и зеленые) наследовалась бы как один признак.

Генетики предпочитают изучать сцепление посредством анализирующего скрещивания, т. е. скрещивания с родительской линией, гомозиготной по рецессивным генам (рис. 5.2). При анализирующем скрещивании фенотип потомства прямо отражает типы гамет, формируемые гетерозиготным родителем, как это показано для случаев независимого расщепления и полного сцепления на рис. 5.3. В первом из представленных на рис. 5.3 случаев при независимом расщеплении аллелей двух генов следует ожидать, что в равном отношении образуются четыре генотипа. Два из них содержат те же сочетания аллелей, что и у родителей (a^+b^+ и ab), а два – новые рекомбинантные сочетания аллелей (a^+b и ab^+). Если в потомстве родительские типы и рекомбинантные типы представлены в равном отношении, то, значит, гены *a* и *b* в мейозе гетерозиготного родителя расходятся независимо и могут быть названы несцепленными. Частота рекомбинации между двумя генами определяется как доля обоих рекомбинантных типов в потомстве (в примере, представленном на рис. 5.3, 50/100 = 0,5, или 50%). Если гены находятся в независимо расходящихся разных хромосомах, то частота рекомбинации равна 50%. Обратное, как мы вскоре увидим, вообще говоря, не всегда справедливо.

Во втором из представленных на рис. 5.3 случаев абсолютная связь между двумя генами ведет к тому, что в потомстве от анализирующего скрещивания следует ожидать появления лишь двух генотипов. Такое полное сцепление может служить веским, хотя и не исчерпывающим свидетельством в пользу того, что оба гена расположены в одной хромосоме.

На рис. 5.3 приведен пример анализирующего скрещивания, выявляющего полное сцепление двух рецессивных аутосомных признаков

Рис. 5.4. Полное сцепление, наблюдаемое в анализирующем скрещивании у дрозофилы, когда самец гетерозиготен по обоим локусам.



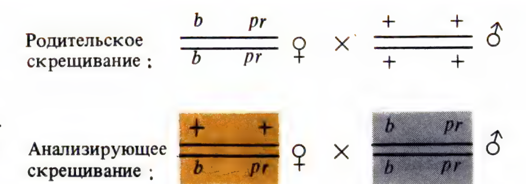
	Генотип	Фенотип	Наблюдаемое количество	Ожидаемое при независимом расщеплении
Потомство: Родительские типы	b pr / b pr	Черное тело Пурпурные глаза	374	193
	+ + / b pr	Дикий тип	398	193
Рекомбинантные типы	b + / b pr	Черное тело	0	193
	+ pr / b pr	Пурпурные глаза	0	193
		Всего:	772	772

дрозофилы: черный цвет тела (*b*) и пурпурные глаза (*pr*). Если самец гетерозиготен по обоим генам, то комбинации аллелей в спермиях тождественны их комбинации в родительском генотипе, в результате чего в потомстве у половины мух тело черное и глаза пурпурные, а вторая половина потомства принадлежит дикому типу. Рекомбинантных сочетаний родительских аллелей не наблюдается: ни черных мух с нормальными глазами, ни мух с нормальным цветом тела и пурпурными глазами в потомстве нет. Представленные на рис. 5.4 данные указывают на полное сцепление генов, изучавшихся в этом скрещивании, из чего следует, что оба гена расположены в одной и той же хромосоме.

Полного сцепления между аллелями двух различных генов обычно не наблюдается. Действительно, если признаки «черное тело и пурпурные глаза» всегда полностью сцеплены, т. е. всегда в мейозе расщепляются вместе, то мы вправе предположить, что оба признака являются проявлениями одного мутантного гена. Причину, по которой эти два гена ведут себя при скрещивании, представленном на рис. 5.4, как полностью сцепленные, мы обсудим после того, как рассмотрим результаты аналогичного скрещивания, в котором самка гетерозиготна по обоим генам.

В этом случае, как показано на рис. 5.5, в потомстве представлены четыре типа: два родительских (черное тело, пурпурные глаза и дикий тип) и два рекомбинантных (черное тело, нормальные глаза и нормальное тело, пурпурные глаза). Это те четыре типа, которых следует ожи-

Рис. 5.5. Частичное сцепление, наблюдаемое при анализирующем скрещивании у дрозофилы, когда гетерозиготна по обоим локусам самка.



	Генотип	Фенотип	Наблюдаемое количество	Ожидаемое при независимом расщеплении
Потомство : Родительские типы	b pr / b pr	Черное тело Пурпурные глаза	210	120
	+ + / b pr	Дикий тип	240	120
Рекомбинантные типы	b + / b pr	Черное тело	14	120
	+ pr / b pr	Пурпурные глаза	16	120
		Всего :	480	480

дать, если анализируемые гены расходятся независимо. Однако мух рекомбинантных типов много меньше, чем мух, имеющих родительский генотип (30/450), тогда как при независимом расхождении их число должно было бы быть примерно одинаковым (240/240). Такое отклонение от ожидаемого при независимом расщеплении свидетельствует о наличии сцепления. Генетики оценивают степень сцепления в таком скрещивании частотой рекомбинантных типов в потомстве: частота рекомбинаций в этом случае равна 30/480 = 0,0625, или 6,25%. Частота рекомбинаций для несцепленных генов равна 50% (240/480 = 0,50).

Рекомбинантные типы при таком скрещивании (рис. 5.5) возникают из рекомбинантных гамет, образующихся у самки в процессе кроссинговера при мейозе. Кроссинговер обычно происходит в мейозе всех организмов, и у самцов, и у самок, и во всех парах гомологичных хромосом. Однако у самцов многих видов насекомых отряда *Diptera*, в том числе и у дрозофил, кроссинговер не происходит и рекомбинантные гаметы не возникают. Вот почему в скрещивании, представленном на рис. 5.4, аллели генов, находящихся в одной хромосоме, расходятся всегда вместе, т.е. ведут себя так, как этого следует ожидать при полном сцеплении.

Рис. 5.6 знакомит нас с примером наследования двух сцепленных генов *Drosophila melanogaster*, находящихся в X-хромосоме. Все мужское потомство получает свою единственную X-хромосому от матери, и эта X-хромосома может быть как родительского, так и рекомбинантного типа. В этом примере анализирующее скрещивание гетерозиготной по обоим генам самки с самцом-носителем рецессивных аллелей обоих ге-

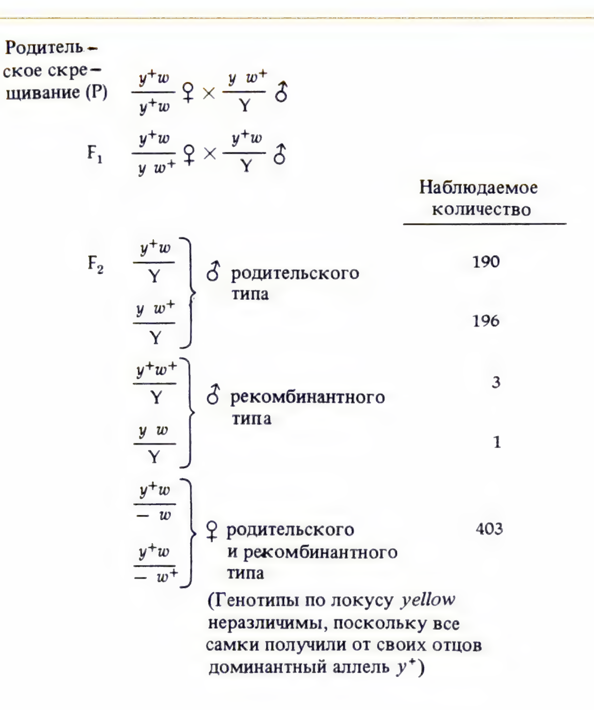


Рис. 5.6. Генотипы потомства в поколении F_2 от скрещивания между самцами дрозофил с желтым телом (*yellow*) и самками с белыми глазами (*white*). Гемизиготность мужского потомства по X-хромосоме позволяет определять генотипы самцов по их фенотипам, так же как в случае аутосом при анализирующем скрещивании. У самок в F_2 генотипы нельзя определить по фенотипам.

нов не обязательно, поскольку частоту рекомбинации можно определить по фенотипам гемизиготного мужского потомства. В Y-хромосоме нет аллелей соответствующих генов, расположенных в X-хромосоме. В этом скрещивании двумя маркерами служили ген желтой окраски тела (y) и ген белоглазия (w); соответствующие доминантные аллели дикого типа определяют коричневатый цвет тела (y^+) и красные глаза (w^+). Частота рекомбинации между этими генами, наблюдавшаяся при таком скрещивании, составляла $4/390 \approx 0{,}010$.

Анализ частоты рекомбинаций может дать ответы на два вопроса. Первый вопрос состоит в том, принадлежат ли оба гена одной хромосоме. Если наблюдаемая частота рекомбинаций между аллелями каких-либо двух генов меньше 50%, то на этот вопрос можно ответить положительно. Для генов, расположенных в одной хромосоме очень близко друг к другу, наблюдается обычно очень низкая частота рекомбинаций. По мере увеличения расстояния между генами частота рекомбинаций также увеличивается. Более того, кроссинговер между генами, находящимися в одной хромосоме, но сильно удаленными друг от друга, может происходить настолько часто, что наблюдаемая частота рекомбинаций будет близка к 50%, т.е. к значению, соответствующему независимому расщеплению. В таких случаях для определения принадлежности генов одной хромосоме требуется статистический анализ. Иногда хромосомы бывают настолько длинными, что гены, расположенные на разных концах, всегда расходятся независимо. Такие случаи можно выявить, лишь ответив на второй вопрос: каково взаимное расположение сцепленных генов в хромосоме? Рекомбинационный анализ дает ответ и на этот вопрос.

Генетические карты

Впервые порядок генов в хромосоме удалось установить Альфреду Стертеванту при выполнении им дипломной работы в «мушиной» лаборатории Томаса Ханта Моргана. В 1911 г. Морган и его студенты обнаружили существование множества сцепленных с полом мутаций у дрозофилы. Сцепленность с полом не оставляла сомнений в том, что соответствующие гены локализованы в Х-хромосоме. При проведении скрещиваний между линиями, содержащими различные мутации (см., например, рис. 5.6), обнаружилось, что частоты рекомбинации между различными парами генов зависят от того, какая именно пара генов изучается, и почти постоянны для каждой пары. Частоты рекомбинаций, наблюдавшиеся между отдельными парами генов, представлены в табл. 5.1. Стертевант первым понял, что эти данные можно использовать для построения физической модели, или карты Х-хромосомы, на которой указывалось бы относительное расположение различных генов. Говоря более точно, Стертевант доказал на основании этих данных, что карта должна быть линейной, или одномерной, т. е. иметь форму, в точности совпадающую с нитевидной формой хромосом, наблюдаемой под микроскопом. Первая генетическая карта Х-хромосомы, построенная Стертевантом на основании данных, представленных в табл. 5.1, изображена на рис. 5.7.

Стертевант рассудил, что если гены расположены вдоль хромосомы, то чем дальше они расположены друг от друга, тем больше вероятность того, что кроссинговер произойдет между ними. Следовательно, частота рекомбинаций между удаленными генами должна быть больше, чем между соседними генами.

Проанализируем на основе этих соображений данные табл. 5.1. Частота рекомбинаций между мутациями *yellow* и *white* составляет 0,010, и, следовательно, они должны быть расположены много ближе друг к другу, чем *yellow* и *vermilion*, частота рекомбинаций между которыми составляет 0,322. Частота рекомбинаций между *white* и *vermilion* равна 0,300, следовательно, *white* должен быть ближе к *vermilion*, чем *yellow*. Аналогичное рассуждение показывает, что *vermilion* расположен рядом с *miniature* (частота рекомбинации 0,030) и что *vermilion* находится ближе к *white*, чем *miniature* (частоты рекомбинаций 0,300 и 0,327 соответственно). Следовательно, *vermilion* должен располагаться между *white*

Таблица 5.1. Частота рекомбинации (между некоторыми сцепленными с полом мутациями *Drosophila melanogaster*

Гены	Частота рекомбинации
Yellow (y)–white (w)	0,010
Yellow (y)–vermilion (v)	0,322
Yellow (y)–miniature (m)	0,355
Vermilion–miniature (m)	0,030
White (w)–vermilion (v)	0,300
White (w)–miniature (m)	0,327
White (w)–rudimentary (r)	0,450
Vermilion (v)–rudimentary (r)	0,269

По *Sturtevant A. H.* (1913). J. Exp. Zool., **14**, 43.

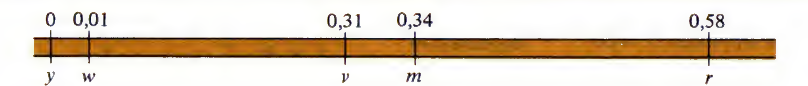


Рис. 5.7. Первая генетическая карта Х-хромосомы *D. melanogaster*; на ней указано взаимное расположение генов *yellow*, *white*, *vermilion*, *miniature* и *rudimentary*. Ген *yellow* произвольно выбран точкой отсчета на генетической карте.

и *miniature*. Наконец, *rudimentary* почти не сцеплен с *white*, так как частота рекомбинаций между ними равна 0,45, т.е. близка к значению 0,50, отвечающему независимому расщеплению. Из того, что *vermilion* более тесно, чем *rudimentary*, сцеплен с *white*, следует, что он расположен между ними, и, значит, *rudimentary* лежит справа от *white*.

Взаимное расположение *white* и *rudimentary* показывает, что, как уже отмечалось ранее, два гена могут принадлежать одной хромосоме и тем не менее наследоваться независимо – для этого они лишь должны быть расположены достаточно далеко друг от друга. Например, ген, находящийся на некотором расстоянии справа от *rudimentary*, будет практически не сцеплен с *white* (т.е. частота рекомбинаций между ними будет неотличимой от 0,50), и тем не менее можно показать, что он принадлежит к той же хромосоме, что и *white*, поскольку оба они сцеплены с *rudimentary*. На рис. 5.7 расстояния между генами соответствуют частотам рекомбинации между ними. Частота рекомбинации, равная 1%, определяет единицу масштаба на генетической карте и называется морганидой или сантиморганидой (в честь Т.Х. Моргана). Положение каждого гена на карте определяется его расстоянием от ближайшего из группы сцепленных генов. Произвольно принято, что ген *yellow* расположен на левом конце карты, т.е.находится в положении 0,0, и положение всех других генов оценивается по сумме частот рекомбинаций между ближайшими соседями. В результате получается, что расстояние между *yellow* и *rudimentary* на карте Х-хромосомы составляет 0,58 сМ.

Трехфакторные скрещивания

В тот день, когда «этот мальчишка Стертевант» (слова Германа Мёллера, в ту пору аспиранта в лаборатории Моргана) представил свое доказательство линейной упорядоченности генетической карты, в лаборатории Моргана царило необычайное возбуждение. Доказательство основывалось на анализе данных по скрещиваниям, в которых расщепление происходило по трем различным локализованным в Х-хромосоме генам (трехфакторное скрещивание).

Перечислим все типы яйцеклеток самки, гетерозиготной по мутациям желтое тело (yellow), белые глаза (*white*) и миниатюрные крылья (*miniature*), т.е. самки с генотипом $ywm/+++$.

Кроме двух родительских комбинаций аллелей возможно еще шесть, поскольку в Х-хромосоме может оказаться любой из двух аллелей каждого гена. Следовательно, общее число возможных комбинаций равно $2 \cdot 2 \cdot 2 = 8$ (рис. 5.8). Поскольку эти гены сцеплены, различные сочетания аллелей возникают с разными частотами, определяемыми комбинацией аллелей в родительских хромосомах и частотой кроссинговеров между каждой парой генов. Эти частоты рекомбинаций приведены на рис. 5.8. Если гены линейно упорядочены вдоль хромосомы, то возможны, как

Рис. 5.8. Результаты анализирующего скрещивания у *D. melanogaster* по трем локусам X-хромосомы.

Анализирующее скрещивание: $\frac{+\ +\ +}{y\ w\ m}$ ♀ × $\frac{y\ w\ m}{Y}$ ♂

Потомство:

Класс	Генотип материнской X-хромосомы сына или дочери	Наблюдаемое количество
Родительский	$+\ +\ +$ / $y\ w\ m$	6972
m рекомбинировал с *y* и *w*	$+\ +\ m$ / $y\ w\ +$	3454
y рекомбинировал с *w* и *m*	$y\ +\ +$ / $+\ w\ m$	60
w рекомбинировал с *y* и *m*	$y\ +\ m$ / $+\ w\ +$	9
		10 495

Частота рекомбинации между:

w и *m* (3454 + 9)/10495 = 0,330
y и *w* (60 + 9)/10495 = 0,007
y и *m* (3454 + 60)/10495 = 0,335

это изображено на рис. 5.9, три различные последовательности их расположения. Одна пара реципрокных рекомбинантных типов из числа представленных на рис. 5.8, не может возникнуть из исходной последовательности посредством одного кроссинговера в мейозе; для ее образования необходимы два кроссинговера в одном мейозе. Другими словами, если три гена линейно упорядочены, то не все возможные рекомбинантные типы могут возникать независимо друг от друга. Как мы уже видели, единичные кроссинговеры происходят между сцепленными генами с частотой, меньшей 1/2. Следовательно, частота рекомбинантных типов, возникающих в результате двух кроссинговеров, должна представлять собой произведение дробей, т.е. быть меньше частоты появления рекомбинантных типов, возникающих в результате одного кроссинговера. Лишь одна из трех возможных последовательностей генов, изображенных на рис. 5.9, согласуется с данными, приведенными на рис. 5.8, а именно *y–w–m*. Наблюдаемая частота рекомбинаций между *y* и *w* равна 0,007, а между *w* и *m* – 0,330. Следовательно, частота возникновения рекомбинантного класса в результате двойного кроссинговера должна примерно составлять $0{,}007 \cdot 0{,}330 = 0{,}00231$. Самый редкий класс рекомбинантов из числа изображенных на рис. 5.8 – это тот, который появляется в результате кроссинговера между *w* и *y–m* (частота 9/10495 = = 0,00086); следовательно, именно этот класс – продукт двойного кроссинговера. Стертевант показал, что такой тип отношений характерен для любых трех генов в X-хромосоме и что только линейная генетиче-

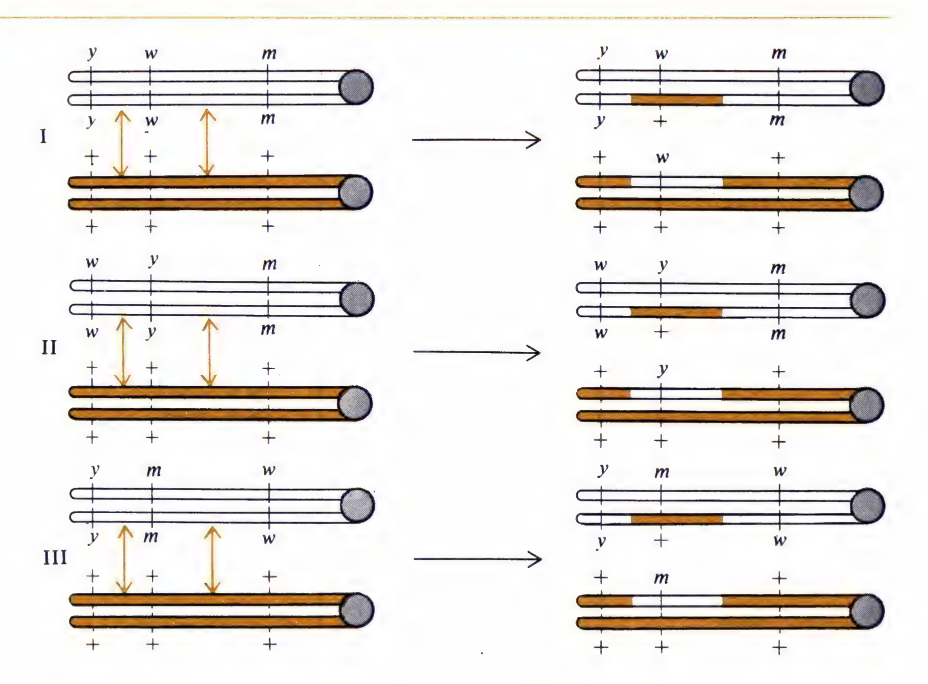


Рис. 5.9. Хроматиды до и после рекомбинаций, предшествующих первому мейотическому делению, у гетерозиготных по трем локусам матерей. Представлены три гипотетически возможных взаимных расположения локусов *yellow*, *white* и *miniature*. С данными, представленными на рис. 5.8, согласуется лишь первая последовательность локусов.

ская карта может соответствовать данным по частоте рекомбинаций во множестве различных скрещиваний, затрагивающих различные тройки генов. Его открытие линейной упорядоченности расположения генов в хромосоме по своему общему значению непосредственно следует за открытием генов Менделем. Линейная модель хромосомы послужила основой для всех последующих работ в генетике и предвосхитила открытие линейной природы молекулы ДНК.

Таким образом, трехфакторные скрещивания позволяют установить порядок расположения трех генов в хромосоме и определить частоты рекомбинаций между ними. Такой способ анализа, впервые разработанный Стертевантом, послужил основой для построения всех генетических карт. Генетическая карта генома *Drosophila melanogaster*, построенная Стертевантом и другими сотрудниками лаборатории Моргана, изображена на рис. 5.10.

Генетическая интерференция

Когда гены расположены не очень далеко друг от друга, частоту рекомбинации можно рассматривать как вероятность того, что рекомбинация произойдет между ними. Такая оценка позволяет определить, независимо ли друг от друга происходят кроссинговеры в одной хромосоме. Если два акта рекомбинации происходят независимо, то ча-

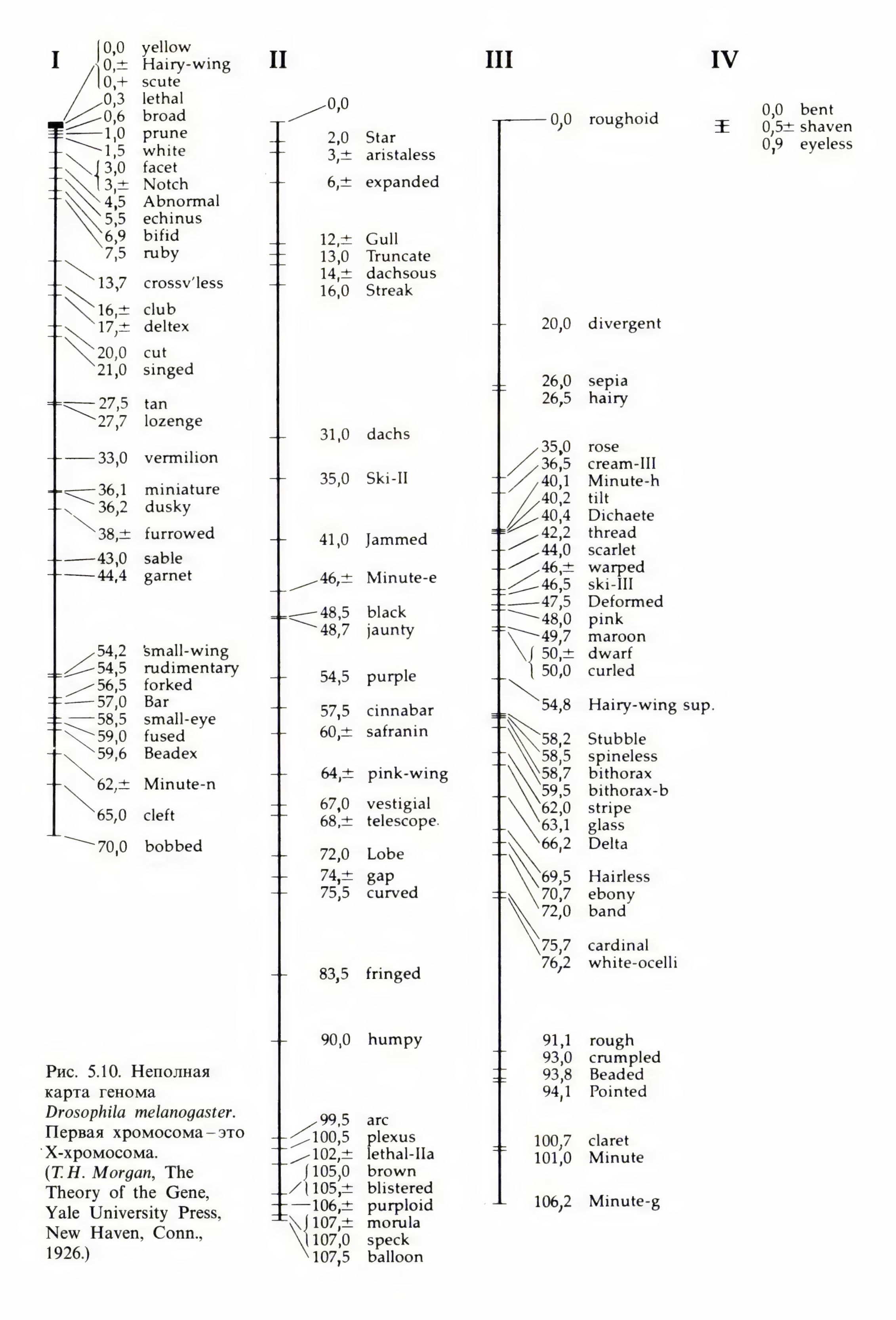


Рис. 5.10. Неполная карта генома *Drosophila melanogaster*. Первая хромосома – это Х-хромосома. (*T. H. Morgan*, The Theory of the Gene, Yale University Press, New Haven, Conn., 1926.)

стота двойной рекомбинации должна быть произведением частот двух соответствующих одинарных рекомбинаций. Из данных, представленных на рис. 5.8, следует, что ожидаемая частота двойного кроссинговера составляет $0{,}330 \cdot 0{,}007 = 0{,}00231$. Наблюдаемая частота двойного кроссинговера, однако, равна лишь $9/10495 = 0{,}00086$, т. е. значительно меньше ожидаемой.

Отношение наблюдаемой частоты двойных рекомбинантов к ожидаемой называется *коэффициентом коинциденции* (совпадения) (c). Акт рекомбинации между y и m делает менее вероятной рекомбинацию вблизи этого участка. Это явление носит название *интерференции* I. Мерой интерференции служит разность $I = 1 - c$. В рассмотренном примере $I = 1 - 0{,}00086/0{,}00231 = 1 - 0{,}374 = 0{,}626$.

Наблюдаемое значение I сильно зависит от того, какие именно локусы изучаются в данном скрещивании. Если локусы расположены далеко друг от друга и разделены центромерой, I может быть равно нулю. Для близких локусов $I \simeq 1$, и поэтому при построении генетических карт используется частота рекомбинации между близко расположенными маркерами.

Когда происходит кроссинговер?

Кроссинговер происходит на четырехцепочечной, или тетрадной, стадии мейоза, когда каждая хромосома состоит из двух сестринских хроматид (см. гл. 1). В этом можно убедиться, анализируя генотипы женского потомства самок дрозофил, несущих сцепленные X-хромосомы и гетерозиготных по мутации, локализованной в этой хромосоме.

Нормальная X-хромосома дрозофилы – телоцентрик, т. е. центромера расположена на конце хромосомы. При сцеплении X-хромосом (X · X) две X-хромосомы соединены одной центромерой и таким образом образуют метацентрическую хромосому, у которой каждое плечо фактически представляет собой полноценную X-хромосому (см. гл. 3). В хромосомном наборе самок со сцепленными X-хромосомами присутствует обычно еще и Y-хромосома (X · X/Y). Наличие Y-хромосомы у таких самок не оказывает влияния на их физиологию, поскольку пол определяется количеством X-хромосом в наборе. Y-хромосома необходима лишь для обеспечения плодовитости самцов. У самок со сцепленными X-хромосомами происходит необычное расщепление сцепленных с полом генов (см. рис. 3.9). Лишь половина зигот таких самок развивается нормально, давая женское потомство (со сцепленными материнскими X-хромосомами и отцовской Y-хромосомой) и мужское потомство с отцовской X-хромосомой и материнской Y-хромосомой.

Некоторая часть женского потомства самок со сцепленными X-хромосомами, в которой оба гомолога гетерозиготны по рецессивным мутациям, оказывается гомозиготной по одной или нескольким рецессивным мутациям. Частота, с которой данная мутация переходит в сцепленных X-хромосомах в гомозиготное состояние, возрастает с увеличением расстояния от соответствующего локуса до центромеры. Следовательно, возникновение таких новых генотипов по сцепленным X-хромосомам происходит в результате кроссинговера. Их появление возможно только в том случае, если кроссинговер происходит на тетрадной ста-

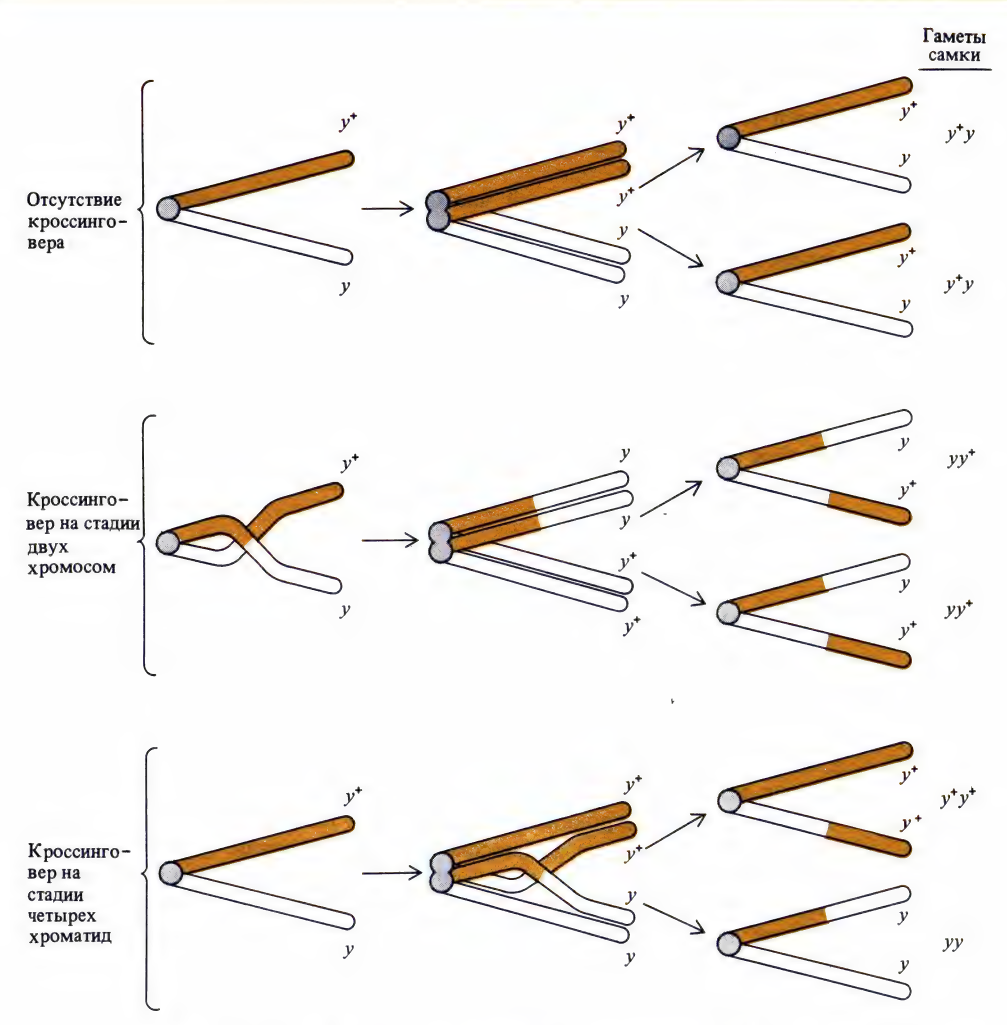


Рис. 5.11. Для того чтобы в мейозе из гетерозиготной сцепленной Х-хромосомы могла образоваться гомозиготная сцепленная Х-хромосома, необходимо, чтобы кроссинговер происходил на стадии четырех хроматид. Кроссинговер должен происходить между центромерой и мутантным локусом.

дии мейоза, как это изображено на рис. 5.11. Рекомбинация на любой другой стадии, предшествующей тетрадной, т. е. до дупликации хромосом, не приводила бы к такому результату.

Мейоз у грибов

У некоторых организмов, например у грибов, можно идентифицировать продукты тетрады и определить их генотипы. У хлебной плесени *Neurospora crassa* мейоз происходит сразу после слияния ядер различных половых типов в клетке, называемой *аском* (пол или половой

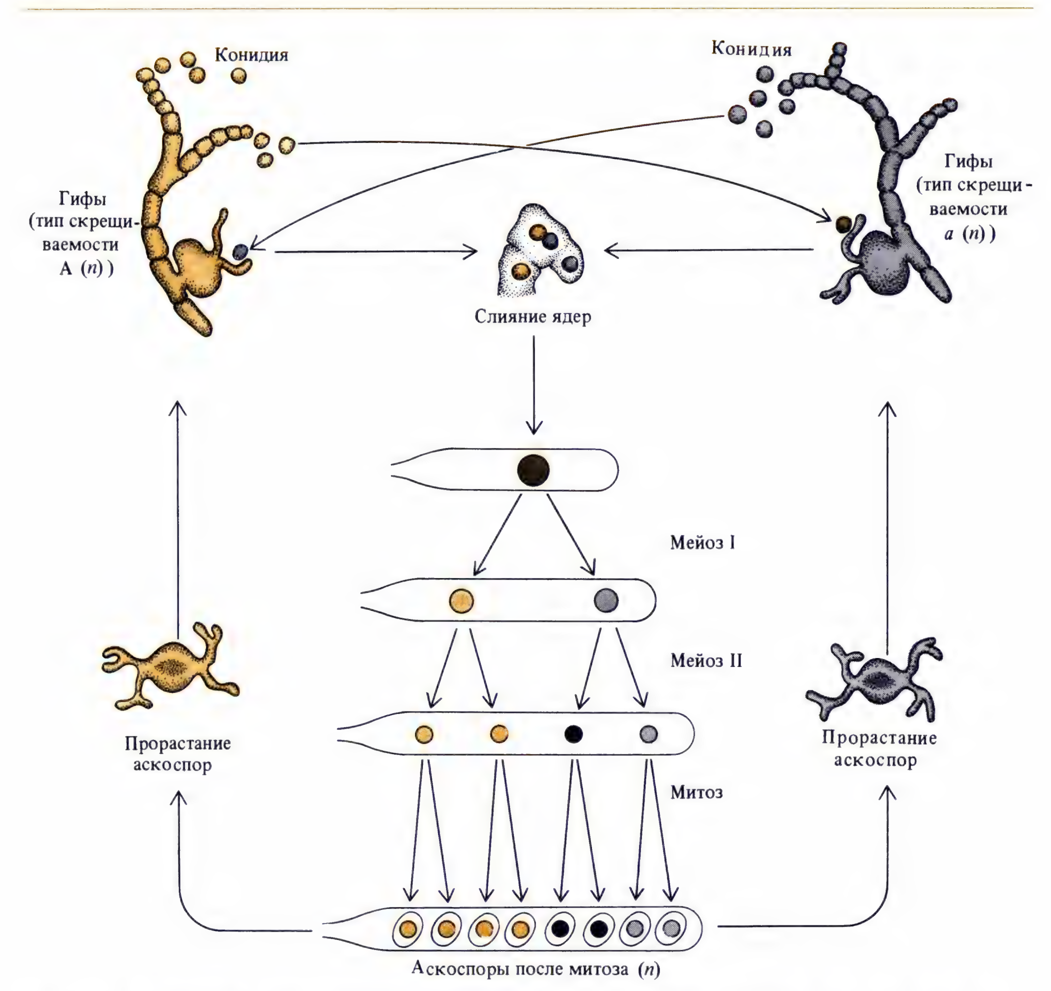


Рис. 5.12. Жизненный цикл *Neurospora*; показан механизм линейного упорядочения аскоспор, являющихся продуктами мейотического деления ядер в аске. Во втором мейотическом делении нити веретена не перекрываются, и ядра каждой половины аска сохраняют центромеры, разошедшиеся в первом мейотическом делении. Соответственно, нити последующего митотического деления также не перекрываются, так что ядра каждой четверти аска содержат сестринские митотические хроматиды с центромерами, разошедшимися во втором мейотическом делении. Таким образом, аскоспоры в аске оказываются упорядоченными в отношении центромер, расходившихся в первом и втором мейотических делениях.

тип у плесени определяется аллелем одного гена). В результате двух последовательных мейотических делений и одного митоза в аске образуется восемь спор. Веретено первого деления не перекрывает веретено второго деления, так что последовательность спор в аске отражает последовательность расхождения центромер в первом и втором мейотических делениях (рис. 5.12). Такое упорядоченное расположение спор дает возможность выявить кроссинговеры, происходящие как между центромерой и мутантными генами, так и между самими мутантными

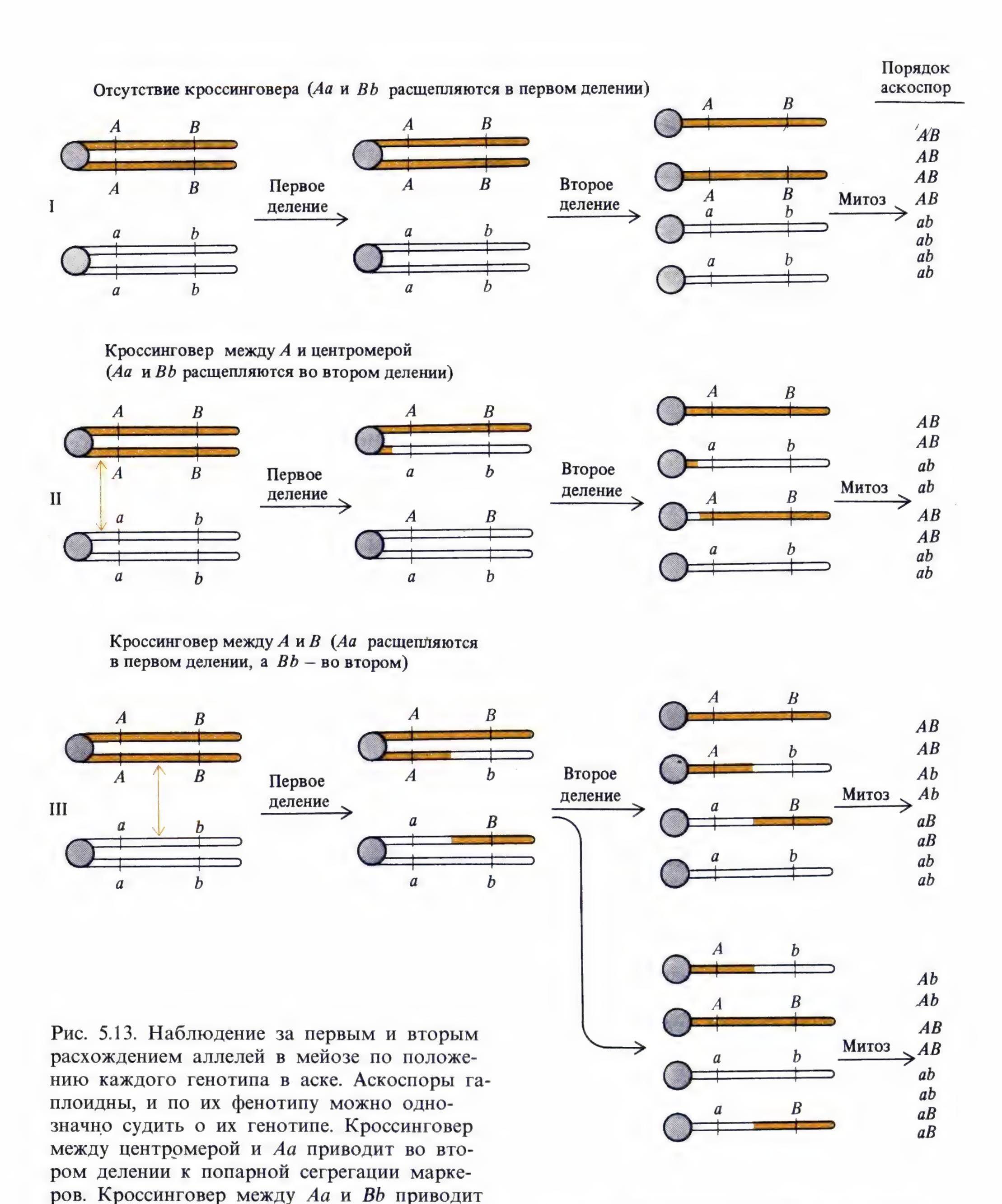


Рис. 5.13. Наблюдение за первым и вторым расхождением аллелей в мейозе по положению каждого генотипа в аске. Аскоспоры гаплоидны, и по их фенотипу можно однозначно судить о их генотипе. Кроссинговер между центромерой и *Aa* приводит во втором делении к попарной сегрегации маркеров. Кроссинговер между *Aa* и *Bb* приводит в первом делении к расхождению проксимальных маркеров (*Aa*), а во втором делении – к расхождению дистальных маркеров (*Bb*). В последнем случае в зависимости от того, как располагаются рекомбинантные хромосомы в первом делении, возможны четыре различные последовательности спор в аске; на рисунке представлены две из них.

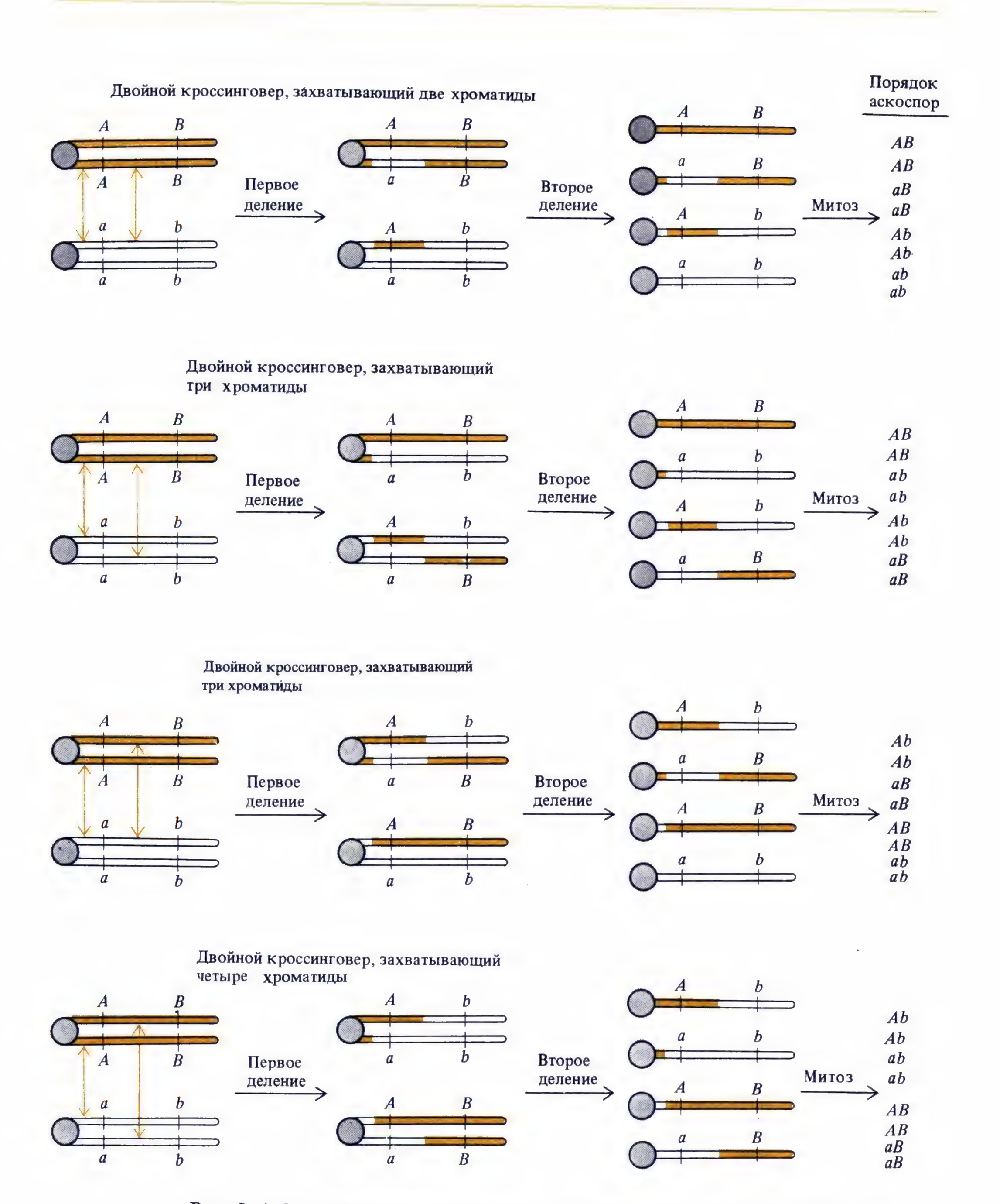


Рис. 5.14. По последовательности спор в аске можно выделить четыре типа двойных кроссоверов.

генами (рис. 5.13). В отсутствие кроссинговера аллели расходятся в первом мейотическом делении и попадают в споры, расположенные в противоположных концах аска. Если происходит один кроссинговер между центромерой и различными аллелями одного гена, то аллели расщепляются во втором мейотическом делении, и в результате на противоположных концах аска оказываются споры с двумя родительскими генотипами. Если единственный кроссинговер происходит между двумя генами, то половина спор в аске относится к родительским типам, а половина – к рекомбинантным. Доля асков, содержащих продукты расщепления во втором делении, служит мерой генетического расстояния между центромерой и исследуемым локусом. Однако поскольку лишь половина хроматид в тетраде рекомбинанта, то расстояние между геном и центромерой равно лишь половине частоты асков с продуктами расщепления во втором делении. Упорядоченное расположение спор у хлебной плесени позволяет, таким образом, определить положение центромеры по отношению к мутантным аллелям генов соответствующей хромосомы.

На рис. 5.14 изображены четыре типа событий, наблюдаемых в тетрадах хлебной плесени при двойном кроссинговере. Существование асков с таким расположением спор, которое возможно лишь в результате кроссинговеров, затрагивающих одновременно три и четыре хроматиды, доказывает, что кроссинговер происходит именно на стадии тетрады, а не на двунитчатой стадии, предшествующей репликации ДНК хромосом. Кроме того, эти данные демонстрируют еще одно важное положение, а именно то, что происходящая в мейозе рекомбинация приводит одновременно к возникновению *реципрокных* рекомбинантных типов.

Цитологические наблюдения кроссинговера

До сих пор мы могли основываться лишь на косвенных данных, полагая, что в основе рекомбинации лежит кроссинговер, т. е. физический обмен реципрокными участками хромосом между двумя разорванными хроматидами. Прямые доказательства были впервые получены в 1931 г. Харриетом Крейтоном и Барбарой Мак-Клинток при исследовании кукурузы и Куртом Штерном на дрозофиле. В обоих случаях данные по генетической рекомбинации совпадали с цитологически наблюдаемым физическим обменом участками хромосом. Результаты, полученные на кукурузе, состояли в следующем. Скрещивали растения кукурузы, гетерозиготные по двум генетическим маркерам, а именно аллелю бесцветности (c) при окрашенном диком типе (c^+) и аллелю восковистости (wx) при крахмалистом диком типе (wx^+), и двум цитологическим маркерам, а именно гетерохроматиновому вздутию и транслокации (рис. 5.15). В потомстве одного из таких скрещиваний было получено 28 зерен четырех различных фенотипов, представленных на рисунке. Зерна были пророщены, и хромосомы каждого растения исследовали на предмет наличия или отсутствия вздутия и транслоцированного участка. Растения wx^+/wx^+ можно было отличить от wx^+/wx, поскольку в первом случае все пыльцевые зерна были крахмалистыми, тогда как во втором случае – лишь половина. Обнаруженная взаимосвязь между

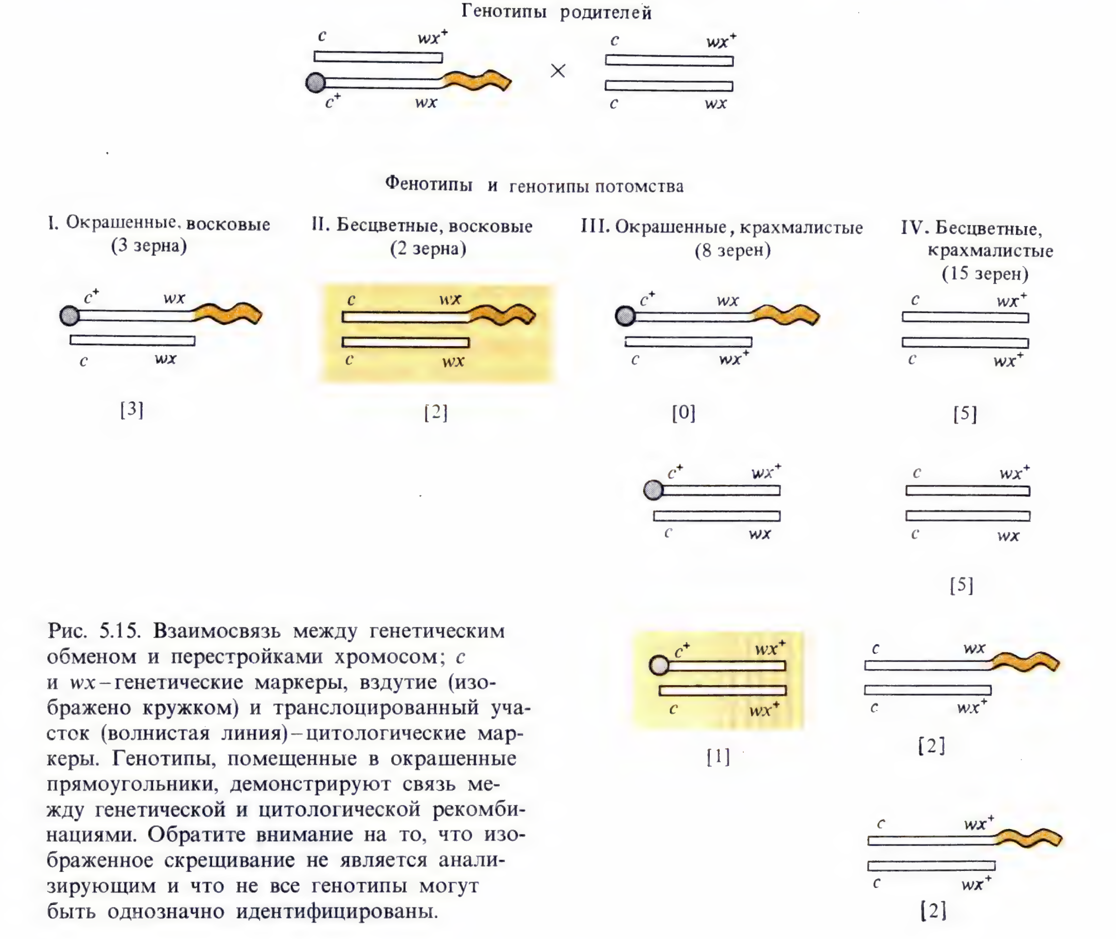


Рис. 5.15. Взаимосвязь между генетическим обменом и перестройками хромосом; *c* и *wx* – генетические маркеры, вздутие (изображено кружком) и транслоцированный участок (волнистая линия) – цитологические маркеры. Генотипы, помещенные в окрашенные прямоугольники, демонстрируют связь между генетической и цитологической рекомбинациями. Обратите внимание на то, что изображенное скрещивание не является анализирующим и что не все генотипы могут быть однозначно идентифицированы.

кроссинговером и цитологическими перестройками свидетельствует о том, что генетический обмен аллелями сопровождается физическим обменом участками хромосом.

Корреляция между генетическими и цитологическими картами хромосом дрозофилы

Большая часть хромосом эукариот, в том числе и хромосомы дрозофил, характеризуется чередованием генетически активных, или *эухроматиновых*, участков и генетически неактивных участков, называемых *гетерохроматиновыми* (см. дополнение 1.1). Большинство известных генов дрозофилы расположены в эухроматиновых участках. В соматических клетках некоторых тканей дрозофилы и других видов двукрылых, в особенности в клетках слюнных желез их личинок, содержатся так назы-

ваемые гигантские хромосомы. Они образуются в результате множества последовательных удвоений хромосом, не сопровождающихся ядерными делениями. В зависимости от вида и стадии развития в каждом ядре каждая хромосомная нить может быть представлена более чем в 1000 копиях, и все нити обоих гомологов располагаются по всей длине в точности друг против друга, образуя политенные интерфазные хромосомы, представляющие собой подобия многожильного троса. Схематическая модель политенной Х-хромосомы изображена на рис. 5.16, а электронная микрофотография ядра клетки слюнных желез дрозофилы – на рис. 5.17. Различия в содержании белка и в степени спирализации интерфазных хромосом обусловливают их поперечную исчерченность, хорошо заметную на рис. 5.18.

У дрозофил известны многочисленные хромосомные аберрации, при которых отдельные участки хромосом утрачиваются (делеции *Df*) или удваиваются (дупликации, *Dp*, см. гл. 21). На цитологических препаратах политенных хромосом с делециями или дупликациями концевые точки этих аберраций обычно можно определить очень точно. На рис. 5.19 изображены границы некоторых известных делеций и дупликаций в Х-хромосоме дрозофилы. Потери генетической информации, свя-

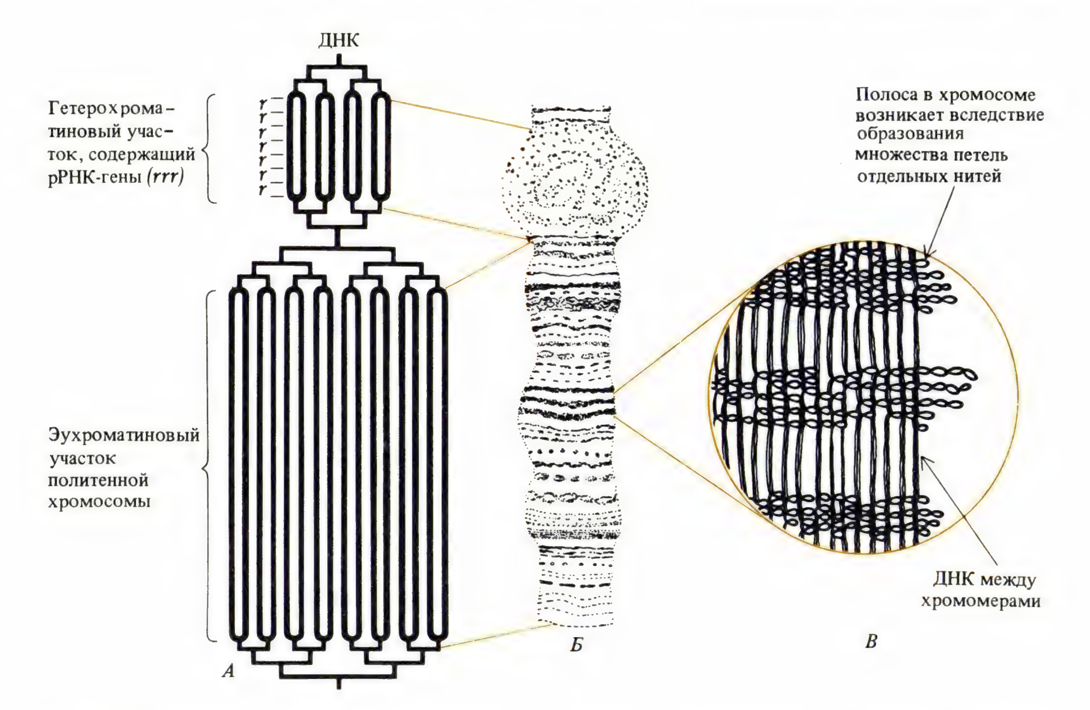


Рис. 5.16. Схематическое изображение вероятной структуры политенной Х-хромосомы из клетки слюнных желез дрозофилы. Последовательные репликации эухроматиновых участков хромосомы доводят число копий примерно до тысячи. *А*. Различия в спирализации по-разному амплифицированных участков гомологичных хромосомных нитей приводят к появлению визуально наблюдаемой поперечной исчерченности (*В*) хромосом. *Б*. Гены рибосомной РНК (рРНК) локализованы в гетерохроматине Х-хромосомы и также частично амплифицированы, однако по неизвестным причинам это не проявляется в виде дискретных линий.



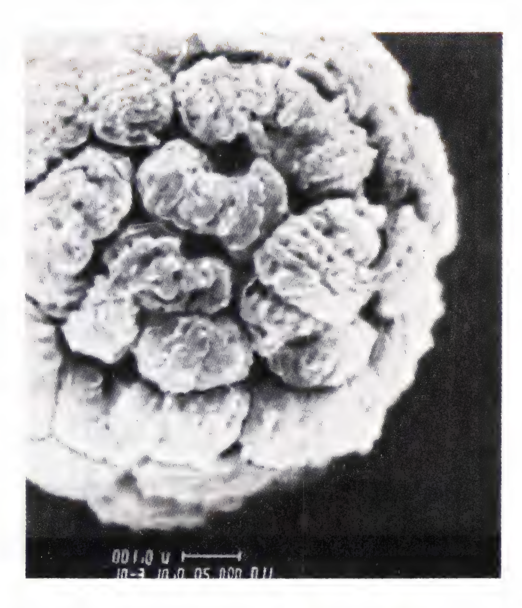
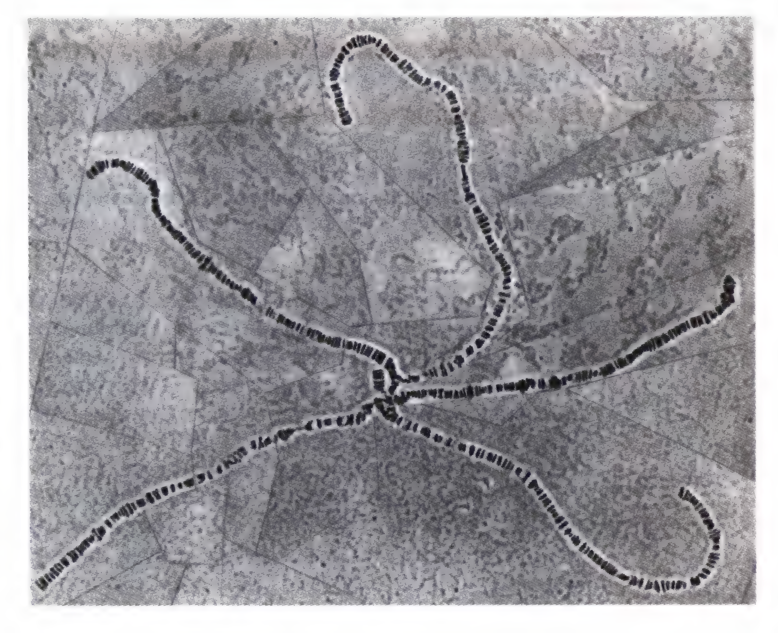


Рис. 5.17. Сделанная на сканирующем электронном микроскопе фотография интактного ядра клетки слюнных желез дрозофилы после удаления ядерной мембраны. Хорошо видна исчерченность. Крупное сферическое образование в середине – это ядрышко. (Dr. *John W. Sedat*, University of California, San Francisco.)



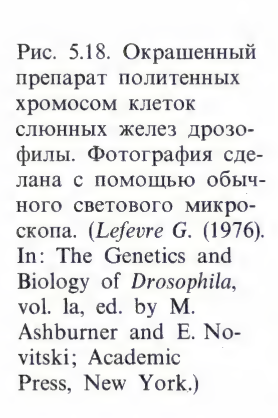


Рис. 5.18. Окрашенный препарат политенных хромосом клеток слюнных желез дрозофилы. Фотография сделана с помощью обычного светового микроскопа. (*Lefevre G.* (1976). In: The Genetics and Biology of *Drosophila*, vol. la, ed. by M. Ashburner and E. Novitski; Academic Press, New York.)

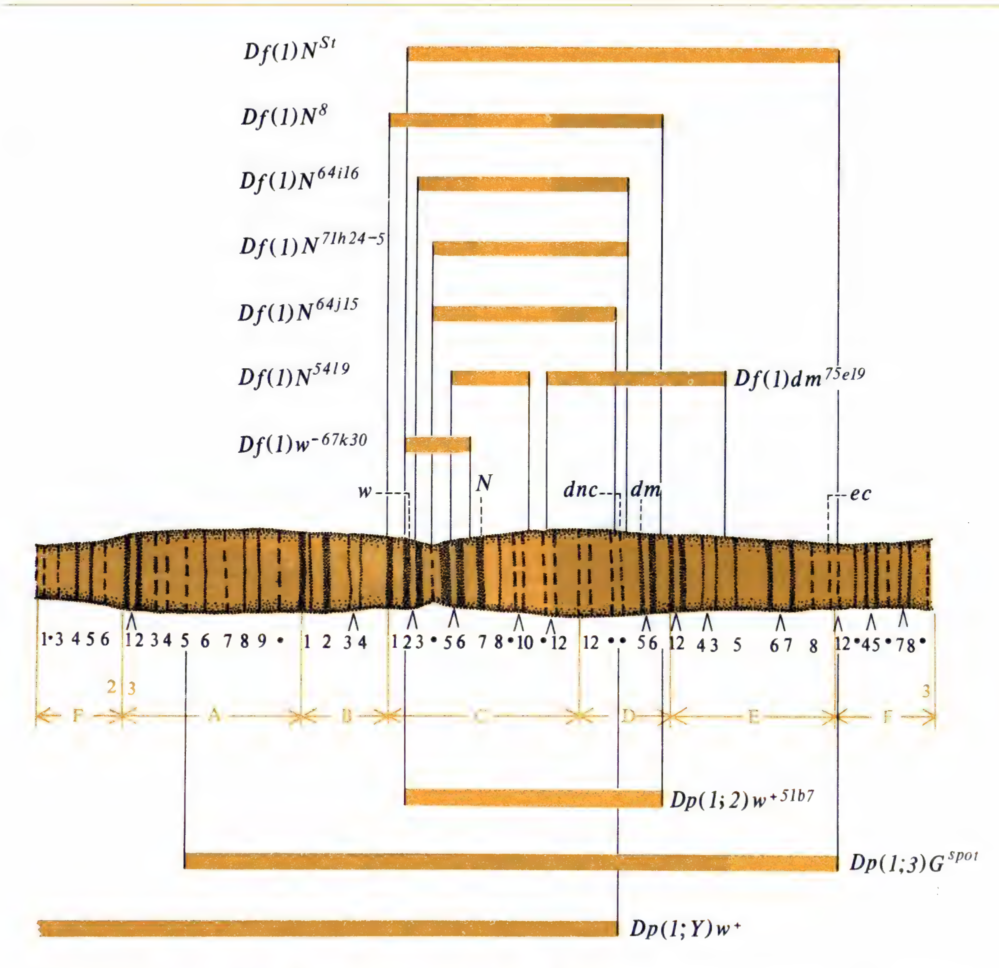


Рис. 5.19. Схема участка политенной X-хромосомы дрозофилы. Указана цитологическая локализация некоторых обсуждающихся в тексте делеций и дупликаций. [*Kiger J. A., Jr., Golanty E.* (1977). Genetics. **85**, 609.]

занные с делециями, фенотипически проявляются у гетерозигот по рецессивным мутациям. Например, у гетерозигот $Df(1)N^8/w$, $Df(1)N^{St}/w$ и $Df(1)N^{-67k30}/w$ глаза белые, что указывает на то, что в хромосомах с этими тремя нехватками ген w^+ отсутствует, и, следовательно, этот ген расположен в участке, общем для всех трех делеций, т. е. в полосах 3C2–3C6. У гетерозиготы $Df(1)N^{64\cdot 16}/w$ глаза красные, таким образом, ген w^+ в этой хромосоме присутствует. Следовательно, ген w^+ должен быть расположен между левыми концами делеций $Df(1)N^{64i16}$ и $Df(1)N^{St}$ или $Df(1)w^{-67k30}$, т. е. должен находиться в полосе 3C2. Заметим, что полоса 3C2 находится внутри всех трех дупликаций, представленных на рис. 5.19. Эти участки могут быть транслоцированы во вторую аутосому, в третью аутосому и в Y-хромосому соответственно, и во всех трех случаях можно установить присутствие гена w^+ в геноме, что подтверждает локализацию w^+ в полосе 3C2. Например, самцы

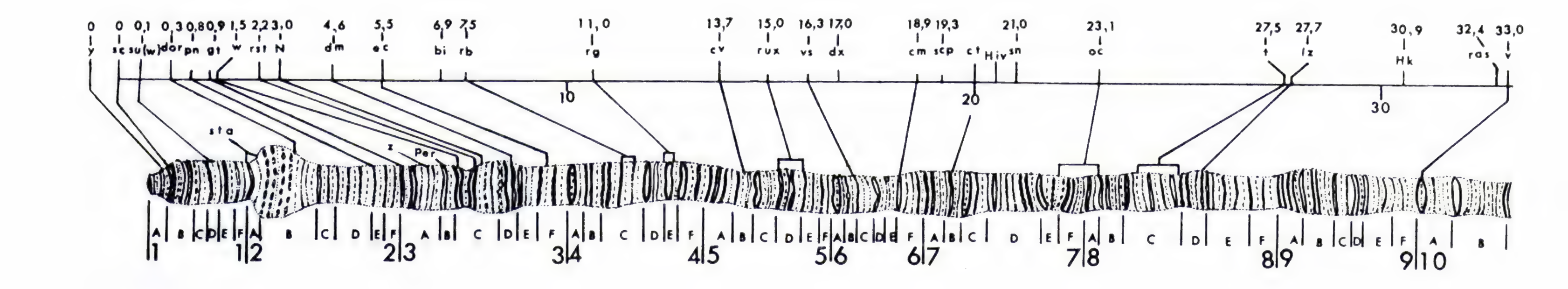


Рис. 5.20. Генетическая карта некоторых мутаций, известных в Х-хромосоме *D. melanogaster*. Указаны связи генетической карты с цитологической структурой политенных хромосом слюнных желез. (Handbock of Genetics, 1975, vol. 3, ed by R.C. King, Plenum Press, New York.)

с генотипом $w/Dp(1; Y)w^+$ обладают красными глазами, отсюда следует, что ген w^+ содержится в участке X-хромосомы, транслоцированном на Y-хромосому. Такие цитологические сопоставления были проведены для многих генов, локализованных в различных хромосомах дрозофилы, и они убедительно продемонстрировали, что генетическая карта каждой хромосомы, полученная на основе данных по рекомбинации, хорошо соответствует реальной физической структуре хромосом (рис. 5.20). Неполное количественное совпадение между расстояниями на генетической карте и реальными расстояниями в политенной хромосоме может быть следствием неравномерного растяжения различных участков хромосомы в процессе приготовления хромосомных препаратов. Возможно, однако, что некоторые участки X-хромосомы участвуют в генетической рекомбинации чаще других и вследствие этого на генетической карте занимают больше места, чем на физической.

Внеядерная наследственность

Принципы генетического анализа применялись при исследовании многих эукариотических организмов: высших животных и растений, а также более просто устроенных эукариот, таких как грибы, водоросли и простейшие. Составлены подробные хромосомные карты множества различных видов, представляющих научный или практический интерес. Эти карты детально описывают организацию генов в ядрах клеток. Однако не все эукариотические гены локализованы в хромосомах клеточных ядер. Вскоре после переоткрытия менделевских законов наследования стало ясно, что некоторые типы изменчивости не подчиняются этим законам. В 1909 г. Карл Корренс опубликовал работу по наследованию пестролистности у *Mirabilis jalapa*, в которой был описан неменделевский тип наследования.

Для многих видов декоративных растений характерна пестролистность – появление белых или желтых пятен и полос на листьях зеленых растений (рис. 5.21). Желтые участки могут быть небольших размеров,



Рис. 5.21. Пестролистность у распространенного декоративного растения.

Таблица 5.2. Потомство от скрещивания растений *Mirabilis jalapa* с различными типами цветков[1]

Отцовское растение	Материнское растение	Потомство
	Желтое	Желтое
Желтое	Пестролистное	Желтое, пестролистное и зеленое
	Зеленое	Зеленое
	Желтое	Желтое
Пестролистное	Пестролистное	Желтое, пестролистное и зеленое
	Зеленое	Зеленое
	Желтое	Желтое
Зеленое	Пестролистное	Желтое, пестролистное и зеленое
	Зеленое	Зеленое

По *Srb A. M., Owen R. D., Edgar R. S.*, 1965. General Genetics, 2nd ed., W. H. Freeman, San Francisco.

однако иногда желтыми становятся целые побеги, тогда как другие остаются зелеными или пестрыми. Корренс брал пыльцу с цветков, растущих на желтых, пестрых и зеленых побегах, и наносил ее (предварительно удалив тычинки) на пестики цветов, растущих на побегах всех трех типов. Оказалось, что свойства проросших из таких семян растений определяются исключительно характером материнского цветка и не зависят от свойств цветка, с которого была взята пыльца (табл. 5.2). Эти результаты были первым примером внеядерной, или цитоплазматической, наследственности.

В настоящее время мы знаем, что зеленый цвет растений определяется хлоропластами, содержащими фотосинтетический пигмент хлорофилл. Зеленые хлоропласты развиваются из самостоятельно делящихся органелл, называемых пластидами, и находящихся в цитоплазме клеток растений. Пластиды клеток из желтых участков пестролистных растений не способны развиться в нормальные зеленые хлоропласты. Растения, выросшие из семян, завязавшихся в цветках на желтых побегах (табл. 5.2), не способны к фотосинтезу и скоро погибают. Пестролистность растения является следствием присутствия в цитоплазме зародыша обоих типов самореплицирующихся пластид. В каждой клетке растения содержится сравнительно небольшое число пластид. По мере роста растения посредством клеточных делений некоторые дочерние клетки получают случайно лишь нормальные пластиды, другие – лишь неспособные к фотосинтезу, третьи – смесь и тех и других. Эти клетки дают начало соответственно зеленым, желтым и пестролистным побегам. Представленные в табл. 5.2 результаты показывают, что пластиды семян наследуются от материнской цитоплазмы, а не от пыльцы. Этот вывод впоследствии был подтвержден микроскопическими наблюдениями.

Способностью к саморепликации лишенные хлорофилла пластиды (а значит, и нормальные пластиды) обязаны содержащейся в них ДНК, в которой генетически закодированы функции, необходимые для нормальной жизнедеятельности пластид. ДНК выделена из хлоропластов растений многих видов. Ее выделение часто облегчается тем, что ну-

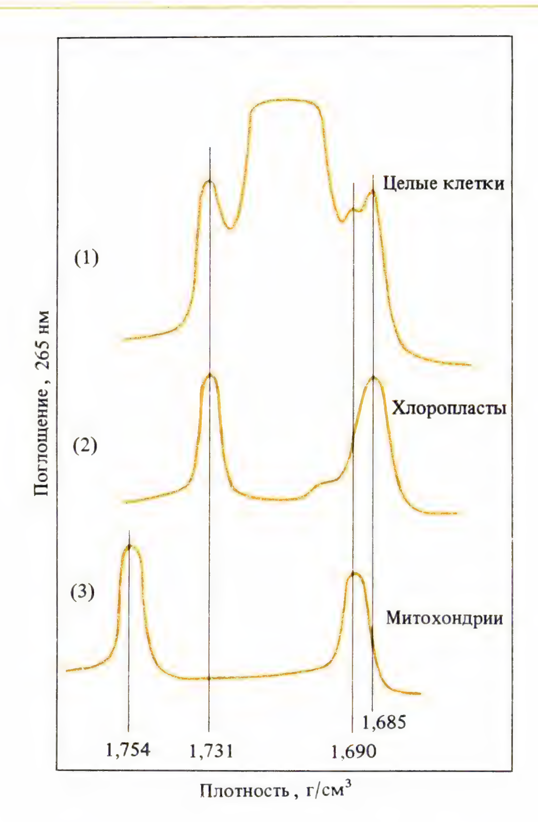


Рис. 5.22. Центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия ДНК, выделенной из (1) целых клеток, (2) очищенных хлоропластов и (3) очищенных митохондрий *Euglena glacilis*. Плотность ДНК 1,754 и 1,731 соответствует специальным маркерам, добавленным в препарат перед центрифугированием. [*Manning J. E., Wolstenholme D. R., Ryan R. S., Hunter J. A., Richards O. C.* (1971). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **68**, 1169.]

клеотидный состав ДНК многих хлоропластов сильно отличается от состава ядерной ДНК, и, следовательно, эти две фракции легко разделяются при центрифугировании в градиенте хлористого цезия. Например, ДНК хлоропластов фотосинтезирующих одноклеточных водорослей *Euglena glacilis* имеет плотность 1,685 г/см^3, и ее можно легко идентифицировать как сателлит ядерной ДНК, обладающий более высокой плотностью (рис. 5.22). В утративших хлоропласты линиях того же вида ДНК с соответствующей плотностью отсутствует. Выделенные из хлоропластов *Euglena glacilis* молекулы ДНК имеют кольцевую форму и длину 132 000 нуклеотидных пар.

Хлоропласты обладают своей собственной системой синтеза белка, сильно отличающейся от соответствующей системы клеточной цитоплазмы. В них также содержатся пигменты, ферменты и другие белки, необходимые для синтеза углеводов из углекислого газа и воды при участии солнечного света (фотосинтеза). Некоторые из генетических функций, необходимых для фотосинтеза и синтеза белков хлоропластами, закодированы в ДНК хлоропластов, другие – в ядерной ДНК. Механизмы фотосинтеза и другие функции хлоропластов активно исследуются посредством генетического анализа мутаций, затрагивающих эти функции. Некоторые из этих мутаций при скрещиваниях обнаруживают менделевское расщепление и, следовательно, относятся к генам ядерной ДНК. Для других характерно неменделевское наследование; следовательно, соответствующие гены локализованы в хлоропластах.

В выделенной из *Euglena* ДНК присутствует еще одна сателлитная фракция, сохраняющаяся в клетках, лишенных хлоропластов (рис. 5.22). Этот тип ДНК локализован в митохондриях – органеллах, ответственных за дыхательную активность клеток. В митохондриях в процессах окислительного фосфорилирования и в цикле трикарбоновых кислот образуется большая часть АТР (аденозинтрифосфата) клетки. АТР – это основной источник энергии, расходуемой на все метаболические реакции клетки. Митохондрии, так же как и хлоропласты, способны к саморепликации. В их ДНК закодировано множество функций, необходимых для нормальной дыхательной активности.

Литература

Creighton H. B., McClintock B. (1931). A correlation of cytological and genetical crossing-over in *Zea mays*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **17**, 492–497.

Gillham N. W., 1977. Organelle Heredity, Raven Press, New York.

Lewis E. B., ed., 1961. Selected Papers of A. H. Sturtevant: Genetics and Evolution, W. H. Freeman, San Francisco.

Muller H. J., 1962. Studies in Genetics: The Selected Papers of H. J. Muller, Indiana University Press, Bloomington.

Sturtevant A. H. (1913). The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association, J. Exp. Zool., **14**, 43–59.

Последние две статьи следует сравнить со статьей Стертеванта (см. выше). Великие открытия часто не принимаются всеми сразу. Кастл предлагал другую интерпретацию данных Стертеванта.

Castle W. E. (1919). Is the arrangement of the genes in the chromosome linear? Proc. Natl. Acad. Sci USA, **5**, 25–32.

Muller H. J. (1920). Are the factors of heredity arranged in a line? Amer. Nat., **54**, 97–121.

Ключевые слова и понятия

Аск
Аскоспора
Внеядерная наследственность
Генетическая интерференция
Генетическая карта
Геном
Гетерохроматин
Коэффициент коинциденции
Кроссинговер
Мутантный ген
Несцепленные гены
Пластиды
Политенная хромосома
Расстояние на карте
Рекомбинация
Реципрокные типы рекомбинантов
Родительские типы
Сателлитная ДНК
Сцепленные гены
Сцепленные Х-хромосомы
Трехфакторное скрещивание
Частота рекомбинации
Эухроматин

Задачи

5.1. Мыши, гомозиготные по мутантному аллелю альбинизма c^e, белые, но с нормальными темными глазами. У особей, гомозиготных по аллелю *p* другого гена, глаза розовые. Проводилось анализирующее скрещивание между мышами с гено-

типом $c^e + /p +$ и мышами, гомозиготными по обеим мутациям; результаты представлены в таблице. Рассчитайте частоту рекомбинации и генетическое расстояние между этими генами.

Фенотип	Число потомков
Белый, глаза темные	240
Белый, глаза розовые	31
Темный, глаза темные	34
Темный, глаза розовые	474

5.2. Проводили анализирующее скрещивание растений томата, гетерозиготных по рецессивным мутациям, вызывающим карликовость растений (*dwarf*) и опушенность плодов (*pubescent*). Нормальные аллели этих генов обусловливают высокий рост растений и гладкость плодов. Результаты скрещивания представлены в таблице.

Фенотип	Число растений
Высокие, гладкие	161
Высокие, опушенные	5
Карликовые, гладкие	5
Карликовые, опушенные	118

Аналогичное анализирующее скрещивание другого растения томата, гетерозиготного по тем же аллелям, дало следующие результаты:

Фенотип	Число растений
Высокие, гладкие	7
Высокие, опушенные	138
Карликовые, гладкие	165
Карликовые, опушенные	4

Почему два скрещивания дали разные результаты? Определите частоту рекомбинации и генетическое расстояние между двумя генами.

5.3. Самки дрозофилы, принадлежащие к линии с укороченными крыльями (*dumpy*), скрещивались с самцами, у которых отсутствуют щетинки (*spineless*). В поколении F_1 все мухи имели нормальный фенотип. В поколении F_2 из 1000 мух 49 имели короткие крылья и были лишены щетинок. В другом эксперименте короткокрылых самок скрещивали с самцами линии *brown* (коричневые глаза). В поколении F_1 все мухи обладали нормальным фенотипом, а в поколении F_2 из 3000 мух не было ни одной с короткими крыльями и коричневыми глазами. Объясните характер сцепленности этих трех генов.

5.4. Рецессивные мутантные гены *a* и *b* находятся на расстоянии 15 морганид. Какова частота появления нормальных особей в потомстве от анализирующего скрещивания, в котором гетерозиготный родитель обладает генотипом $+b/a+$?

5.5. Предположим, что в ситуации, изображенной на рис. 5.2, гены *a* и *b* расположены на расстоянии 10 морганид. Рассчитайте ожидаемые частоты генотипов в поколении F_2. Каковы ожидаемые частоты фенотипов, если аллели *a* и *b* рецессивны?

5.6. Ген *echinus* (*ec*) обусловливает у дрозофил увеличение глазных фасеток, а ген *cut* (*ct*) – аномалию в морфологии крыла (обрезанный край). Самки, гомозиготные по *ec*, скрещивались с самцами, гомозиготными по *ct*. В поколении F_1 все самки были дикого типа, а самцы – типа *echinus*. Распределение фенотипов в поколении F_2 представлено в таблице.

Фенотип	Число мух
Самки с аномалией глаз	490
Самки дикого типа	510
Самцы с аномалией глаз	420
Самцы с аномалией крыльев	434
Самцы с аномалией глаз и крыльев	70
Самцы дикого типа	76

а) Сцеплены ли гены *echinus* и *cut*?

б) Локализованы ли эти гены в аутосоме?

в) Какова частота рекомбинации между ними?

г) Выпишите формулу генотипа для каждого наблюдаемого в потомстве класса особей.

5.7. Сцепленная с полом мутация *chocolate (cho)* обусловливает у дрозофил коричневый цвет глаз. Для того чтобы определить место этого гена на цитологической карте, анализировали фенотипы самок, гетерозиготных по некоторым делециям и этой мутации. Локализация соответствующих делеций изображена на рис. 5.19. На основании представленных здесь сведений определите место гена *cho* на генетической карте.

Генотип	Фенотип глаз
$Df(1)N^{St}/cho$	*cho*
$Df(1)N^{8}/cho$	+
$Df(1)dm^{75e19}/cho$	+

5.8. Коричневый цвет глаз у дрозофил вызывают многие мутации. Рассмотрим две из них: *clot (cl)* и *safranin (sf)*. Проанализируйте представленные здесь результаты скрещивания и ответьте на вопрос: сцеплены ли эти две мутации?

Скрещивание ♀ *cl + / + sf* × ♂ *cl sf/cl sf*

Фенотип потомства	Число мух
Коричневые глаза	73
Глаза дикого типа	27

Затем определяли сцепленность каждой из этих мутаций с мутацией *crinkled (ck)*, обусловливающей развитие гофрированных крыльев. Результаты скрещиваний представлены ниже. Определите, сцеплены ли какие-либо пары генов. При положительном ответе определите взаимное расположение генов и расстояние между ними на генетической карте.

Скрещивание I ♀ *cl + / + ck* × ♂ *clck/clck*

Фенотип потомства	Число мух
Коричневые глаза	300
Гофрированные крылья	340
Коричневые глаза и гофрированные крылья	182
Дикий тип	183

Скрещивание II ♀ *sf + / + ck* × ♂ *sf ck/sf ck*

Фенотип потомства	Число мух
Коричневые глаза	400
Гофрированные крылья	430
Коричневые глаза и гофрированные крылья	93
Дикий тип	92

5.9. У кроликов доминантный ген *B* ответствен за черный пигмент в окраске меха, а рецессивный ген *b* – за коричневый пигмент. Два аллеля локуса альбинизма *chinchilla* (c^{ch}) и *Himalayan* (c^{h}) влияют на распределение пигмента в меховом покрове. Кролики чистой (гомозиготной) линии с шиншилловым черным мехом скрещивались с чистой линией гималайских коричневых кроликов. В F_1 все потомство обладало черным шиншилловым мехом. Затем кроликов из F_1 скрещивали с коричневыми гималайскими; результаты представлены в таблице. Каково сцепление между двумя генами?

Фенотип потомства	Число особей
Черный шиншилловый	244
Коричневый шиншилловый	134
Черный гималайский	109
Коричневый гималайский	233

5.10. Доминантная мутация *Antennapedia (Antp)* в третьей хромосоме дрозофилы превращает усики в конечности; доминантная мутация *Stubble* (*Sb*) вызывает укорочение щетинок; рецессивная мутация *rosy (ry)* обусловливает красновато-коричневый цвет глаз. Производилось скрещивание ♀ *Antp/ry Sb* × ♂ *ry/ry*; результаты представлены в таблице. Определите последовательность рас-

положения мутантных генов, частоту рекомбинаций и расстояние между этими генами на генетической карте. Рассчитайте коэффициент коинциденции и интерференцию.

Фенотип потомства	Число мух
Дополнительные конечности	1140
Короткие щетинки, красновато-коричневые глаза	1078
Дикий тип	58
Дополнительные конечности, короткие щетинки	70
Красновато-коричневые глаза	110
Короткие щетинки	2
Дополнительные конечности, короткие щетинки и красновато-коричневые глаза	43

5.11. Доминантная мутация *Lyra* (*Ly*) в третьей хромосоме дрозофилы приводит к возникновению узких, лирообразных крыльев (эта мутация находится по другую сторону от центромеры относительно мутации *Antp*). Производилось скрещивание ♀ Antp/LySb с самцами дикого типа; результаты представлены ниже. Определите последовательность расположения генов, частоты рекомбинаций и расстояние между генами на хромосомной карте. Рассчитайте по этим данным коэффициент коинциденции и значение интерференции. Сравните значение интерференции, наблюдавшееся при этом скрещивании, со значением, приведенным в условии предыдущей задачи. Как вы можете объяснить эти наблюдения?

Фенотип потомства	Число мух
Дополнительные конечности	851
Лирообразные крылья, короткие щетинки	823
Дополнительные конечности, короткие щетинки	73
Короткие щетинки	42
Лирообразные крылья	77
Дополнительные конечности, лирообразные крылья	18
Дополнительные конечности, лирообразные крылья, короткие щетинки	6
Дикий тип	6

5.12. В третьей хромосоме дрозофилы локализованы рецессивные мутации *bithoraxoid* (*bxd*), вызывающая удвоение груди, и *ebony* (*e*), обусловливающая черный цвет тела. Доминантная мутация *Contrabithorax* (*Cbx*) очень тесно сцеплена с *bxd*, так что в мейозе они расходятся почти всегда вместе. В подвергнутой рентгеновскому облучению линии *bxde*/*bxde* возник сцепленный доминантный супрессор *Su* (*bxd*), подавляющий проявление гена *bxd* и не имеющий никаких других фенотипических проявлений. Самцов *ebony*, гомозиготных также по *bxd* и *Su* (*bxd*), скрещивали с самками, гомозиготными по *Cbx*. Дочерей в потомстве от этого скрещивания подвергали анализирующему скрещиванию с самцами типа *bxde*/*bxde*; потомство Cbx^+, которое также должно быть гомозиготным по гену *bxd*, выглядело следующим образом:

Фенотип потомства Cbx^+	Число мух
Битораксоидные, черные	156
Битораксоидные	72
Черные	256
Дикий тип	9

Определите последовательность расположения генов, частоты рекомбинаций и генетические расстояния. Почему учитывались только четыре фенотипических класса в потомстве, а не все восемь?

5.13. Гены *a*, *b* и *c* расположены на хромосомной карте в алфавитном порядке. Расстояние между генами *a* и *b* 10 сМ, а между *b* и *c* 15 сМ. Коэффициент коинциденции для этих генов равен 2/3. Какова ожидаемая частота гамет + + + у особи с генотипом $ab+/++c$?

5.14. В некоторой линии дрозофил обнаружена доминантная летальная в гомозиготном состоянии мутация *M*, вызывающая утоньшение щетинок, замедление развития. Когда мух–носителей этой мутации–скрещивали с мухами, гомозиготными по рецессивной мутации *rose*, обусловливающей розовый цвет глаз, то розовые глаза наследовались половиной потомства. Аналогично, когда мух–носи-

телей мутации – скрещивали с мухами, гомозиготными по рецессивной мутации *tilt*, то характерный для этой мутации фенотип также проявлялся у половины потомства. Расстояние между генами *rose* и *tilt* составляет 5,2 сМ. Какова наиболее вероятная природа новой мутации *M*?

5.15. Некий рассеянный студент определял положение на карте третьей хромосомы трех мутаций, а именно *rosy* (красновато-коричневые глаза), *groucho* (щетинки над глазами собраны в пучки) и *ebony* (черный цвет тела). К сожалению, он забыл записать генотипы родительских мух. Поэтому он взял самок из F_1, которые все были дикого типа, и поставил анализирующее скрещивание с самцами, гомозиготными по всем трем мутациям. Результаты представлены в таблице.

Фенотип потомства	Число мух
Дикий тип	51
Пучки щетинок	144
Черные	54
Красновато-коричневые глаза	10
Черные с красновато-коричневыми глазами	130
Пучки щетинок, красновато-коричневые глаза	43
Пучки щетинок, черные	7
Черные, пучки щетинок, красновато-коричневые глаза	61

а) Каков генотип самок дикого типа из поколения F_1?

б) Определите последовательность генов на хромосомной карте и расстояния между ними.

5.16. *Drosophila melanogaster* и *D. simulans* – близкородственные виды, способные скрещиваться и дающие гибридное потомство, однако стерильное. У обоих видов известны мутации, обладающие одинаковым фенотипическим проявлением. Тот же фенотип проявляется в гибридном потомстве при скрещивании идентичных мутантов разных видов. Из четырех мутантных генов, известных для обоих видов, два рецессивны, *scarlet* (*st*) и *peach* (*p*), и два доминантны, *Hairless* (*H*) и *Delta* (*Dl*); последние два, правда, одновременно представляют собой рецессивные летали для обоих видов. Относительное расположение этих четырех сцепленных генов на генетических картах обоих видов было установлено по данным анализирующих скрещиваний, представленным в прилагаемой таблице. Постройте карты гомологичных хромосом обоих видов. Что означают полученные вами результаты?

♀ + *H Dl* + /*st* + + *p* × ♂ *st* + + *p*

Фенотип потомства	Число мух *melanogaster*	Число мух *simulans*
H Dl	400	320
st p	423	330
p	18	69
st H Dl	17	75
st	0	181
H Dl p	1	181
H p	2	7
st Dl	2	11
Dl	10	3
st H p	14	0
Dl p	0	0
st H	0	1
Дикий тип	85	41
st H Dl p	91	29
H	0	3
st Dl p	1	1
	1070	1252

5.17. У гаплоидной хлебной плесени *Neurospora crassa* известны два типа скрещиваемости, *A* и *a*. Образование аска происходит лишь при слиянии ядер различных типов. В мейозе типы скрещиваемости ведут себя подобно аллелям одного гена и расходятся в разные аскоспоры. По представленным данным о наборах аскоспор в асках определите расстояние на генетической карте от центромеры до локуса, определяющего тип скрещиваемости.

Положение споры в аске								Число асков
1	2	3	4	5	6	7	8	
A	*A*	*A*	*A*	*a*	*a*	*a*	*a*	105
a	*a*	*a*	*a*	*A*	*A*	*A*	*A*	129
A	*A*	*a*	*a*	*A*	*A*	*a*	*a*	9
a	*a*	*A*	*A*	*a*	*a*	*A*	*A*	5
A	*A*	*a*	*a*	*a*	*a*	*A*	*A*	11
a	*a*	*A*	*A*	*A*	*A*	*a*	*a*	14

5.18. У гаплоидной одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardi* существуют два типа скрещиваемости, mt^+ и mt^-. Слияние ядер различных типов приводит к возникновению диплоидной клетки, претерпевающей впоследствии мейоз. В результате мейоза образуются четыре зооспоры в виде неупорядоченной тетрады. У мутантов *yellow* (*y*) не образуется хлорофилл и клетки оказываются желтыми, тогда как клетки с аллельным геном y^+ зеленые. Мутант sr^2 устойчив к концентрации стрептомицина, летальной для чувствительных клеток (*ss*). При скрещивании $sr^2mt^+y \times ssmt^-y$ были обнаружены следующие типы тетрад:

Типы тетрад				Число
$sr^2mt^+y^+$	$sr^2mt^+y^+$	sr^2mt^-y	sr^2mt^-y	9
sr^2mt^+y	sr^2mt^+y	$sr^2mt^-y^+$	$sr^2mt^-y^+$	15
$sr^2mt^+y^+$	sr^2mt^+y	$sr^2mt^-y^+$	sr^2mt^-y	25

Возвратное скрещивание спор типа sr^2 из потомства с носителями гена *ss* противоположного типа скрещиваемости дало следующие типы тетрад:

Возвратное скрещивание	Число спор	
	с генотипом sr^2	с генотипом *ss*
$sr^2mt^+ \times ssmt^-$	30	0
$sr^2mt^- \times ssmt^+$	0	80

Что вы можете сказать относительно аллелей всех трех генов, участвовавших в скрещивании?

5.19. Как влияют ненаблюдаемые двойные кроссинговеры на оценку расстояний на генетической карте?

5.20. У *Neurospora* мутации *arg* и *thi* блокируют биосинтез аминокислоты аргинина и витамина тиамина соответственно. При скрещивании, в котором происходило расщепление этих мутантных аллелей, были получены аски представленных ниже типов. Каково расположение этих генов друг относительно друга и относительно центромеры?

Положение спор в аске				Число асков
1–2	3–4	5–6	7–8	
arg thi	*arg thi*	+ +	+ +	63
+ *thi*	+ *thi*	*arg* +	*arg* +	60
+ +	+ +	*arg thi*	*arg thi*	58
arg +	*arg* +	+ *thi*	+ *thi*	63

6

Тонкая структура гена

Когда хромосомная теория наследственности обрела признание, гены представлялись чем-то вроде бусин, нанизанных на нить хромосомы, а мутантные аллели одного гена сравнивали с бусинами разного цвета, причем считали, что на хромосомной нити может присутствовать лишь одна бусина определенного цвета. Полагали, что рекомбинация – это разрыв нити в промежутке между бусинами и последующее соединение ее концов; считалось, что внутри генов рекомбинация происходить не может. В представлении генетиков того времени гены были некой неделимой единицей рекомбинации, а также функции и мутации. Эта теория просуществовала примерно до 1940 г., пока разрешающая возможность генетического анализа была относительно невелика.

Затем были обнаружены два замечательных примера того, что дрозофилы дикого типа могут появляться в результате рекомбинации между мутациями, которые в соответствии с фенотипическим критерием должны были бы считаться аллельными. Для обозначения таких мутаций, которые фенотипически выглядят аллельными, но способны рекомбинировать друг с другом, был принят термин *псевдоаллели.* Вопросы, относящиеся к внутренней структуре генов, не были однозначно решены до появления генетики микроорганизмов, для которой характерна очень большая разрешающая способность генетического анализа. В этих работах понятия о единице мутации, единице рекомбинации и единице генетической функции были четко разграничены. Генетические исследования, «расщепившие» ген на субъединицы, начались примерно в то же время, когда Уотсон и Крик предложили свою модель структуры ДНК. Благодаря изучению тонкой структуры гена была заполнена брешь в представлениях о генетической карте и физической структуре молекулы ДНК. Эти исследования опровергли теорию неделимого гена

и привели к концепции гена как последовательности нуклеотидных пар в молекуле ДНК. Они революционизировали генетику также, как революционизировало физику открытие делимости атома в конце прошлого века.

Бактериофаг как генетическая система

Практически все генетические эксперименты с фагами выполняются без непосредственного наблюдения над родителями и потомством. Для определения фенотипов изучаемых генетических вариантов используют косвенные методы. Как уже говорилось в гл. 4, присутствие фагов обычно устанавливают по их способности убивать заражаемые ими бактерии. О присутствии фагов свидетельствуют стерильные пятна (их называют также негативными колониями или бляшками) в сплошном слое бактериальных клеток на поверхности чашки Петри (рис. 6.1). Видимое на поверхности чашки прозрачное пятно – результат гибели бактериальных клеток-хозяев, зараженных потомством этого фага. Следовательно, прежде чем рассматривать генетику фагов, нам надо познакомиться с методами описания фенотипов мутантных фагов. Более углубленно генетика фагов будет рассмотрена в следующей главе.

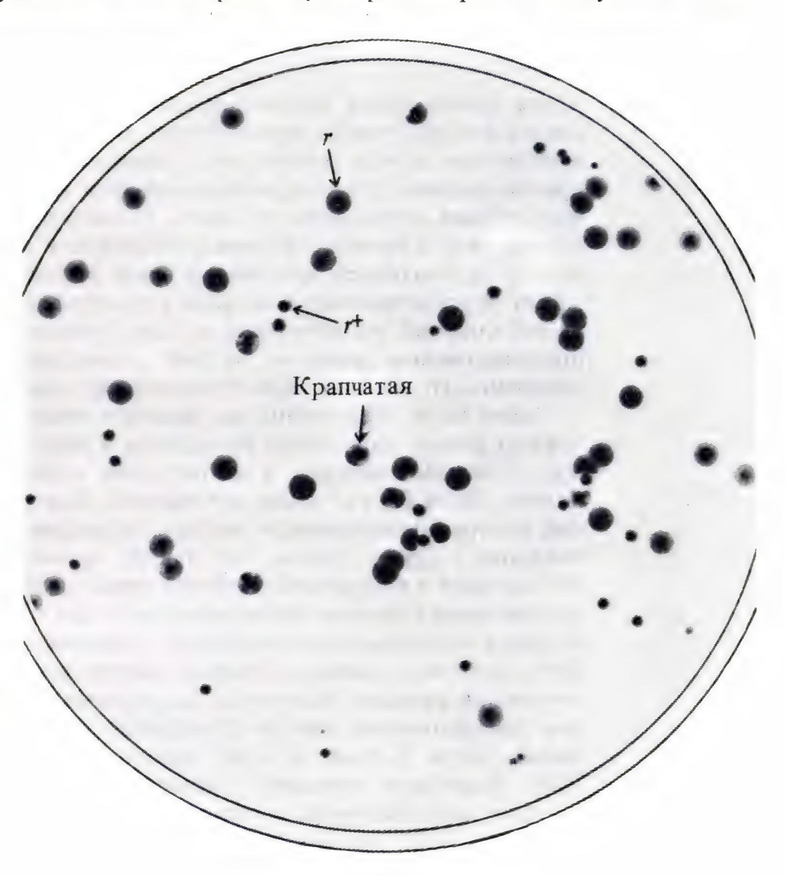


Рис. 6.1. Бактериальный газон *E. coli* B с негативными колониями (бляшками) фагов T4r^+ и T4*rII*. «Крапчатые» бляшки возникают в результате присутствия обоих генотипов. (*Stent G. S., Calendar R.* 1978. Molecular Genetics, 2nd ed., W. H. Freeman, San Francisco.) [Имеется перевод: *Стент Г., Кэлиндар Р.* 1981. Молекулярная генетика, М., Мир.]

Проще всего наблюдать мутации, влияющие на морфологию негативных колоний. Некоторые мутации влияют на их размер. Другие мутации могут давать либо прозрачные, либо мутные бляшки (последнее является следствием того, что от инфекции погибают не все клетки). Такие фаги, как T2, T4 и фX174, убивающие все инфицированные клетки и соответственно дающие прозрачные негативные колонии, называются *вирулентными* фагами. Фаги лямбда и P1 не всегда убивают клетку-хозяина; стерильные пятна, образуемые ими, бывают мутными, а сами фаги называются *умеренными*; они могут существовать внутри бактерии-хозяина в качестве профага, не вызывая ее лизис.

Фаги, заражая бактериальные клетки, прежде всего прикрепляются к специальным рецепторам на поверхности клеток. Природа этих рецепторов генетически контролируется клеткой, и можно выделить мутантные штаммы бактерий, у которых рецептор видоизменен таким образом, что фаг адсорбироваться не может. Мутации фага, дающие ему возможность прикрепляться к бактериям, к которым фаг дикого типа прикрепиться не может, позволяют выделить гены, ответственные за адсорбцию. Мутации, изменяющие морфологию негативных колоний, и мутации, влияющие на адсорбцию фага, исследовались в числе первых; однако они составляют лишь небольшую часть генома фага.

Большая часть фаговых генов контролирует функции, наобходимые для репликации и производства потомства. Мутации этих генов препятствуют появлению потомства и, следовательно, летальны – негативных колоний не образуется вовсе. Летальные мутации фагов, если не считать некоторых специальных обстоятельств, не могут широко распространяться подобно рецессивным леталям у многих эукариот, поскольку фаги гаплоидны. *Условно летальными мутациями* называются мутации, летальные при одних условиях (называемых *непермиссивными* или рестриктивными) и не влияющие на размножение фагов в других условиях (*пермиссивных*). Эти мутации позволяют идентифицировать и изучать большую часть генов фага. Первыми условно летальными мутациями, изученными в генетике фагов, были *rII*-мутации фага T4.

Система *rII* бактериофага T4

Классический анализ тонкой структуры гена был проведен Сеймуром Бензером на *rII*-мутантах фага T4 в 50-х годах. Бензер использовал два селективных преимущества этих мутантов.

Во-первых, *rII*-мутанты можно отобрать в большом количестве, поскольку при посеве на *E. coli* B их негативные колонии имеют очень характерную морфологию. Эти мутанты вызывают быстрый лизис клеток-хозяина, в результате чего их негативные колонии получаются намного крупнее, чем при заражении фагом дикого типа (рис. 6.1). На чашке Петри одна-единственная бляшка *rII* легко может быть выделена из 2000 бляшек типа rII^{+}. Использование химических мутагенов сильно повышает частоту мутаций *rII* по сравнению со спонтанной; соответственно независимо могут быть выделены сотни мутантов *rII*.

Во-вторых, Бензер обнаружил, что *rII*-мутанты не дают потомства, когда они инфицируют клетки *E. coli* K (λ), содержащие профаг λ. *rII*-мутанты прикрепляются к таким клеткам и вводят в них свою ДНК, но инфицированные клетки погибают, не продуцируя фагового потомства.

Таблица 6.1. Морфология негативных колоний фага Т4 дикого типа и *rII*-мутантов

Фаг	Фенотипы при посеве на: *E. coli* B	Фенотипы при посеве на: *E. coli* K (λ)
T4 rII^+	Мелкие бляшки	Мелкие бляшки
T4 *rII*	Крупные бляшки	Бляшки отсутствуют (леталь)

В то же время фаг Т4 дикого типа (rII^+) нормально размножается в *E. coli* K (λ). Это была первая условно летальная система, исследованная в генетике фагов (табл. 6.1). Неспособность *rII*-мутантов к росту в *E. coli* K (λ) дает удобный способ отбора, поскольку на чашке Петри таким способом можно выделить один rII^+-фаг из 10^6 *rII*-фагов. Следовательно, имеется возможность идентифицировать фаги дикого типа, возникающие в результате рекомбинации между двумя различными *rII*-мутантами.

На рис. 6.2 представлена схема эксперимента по скрещиванию бакте-

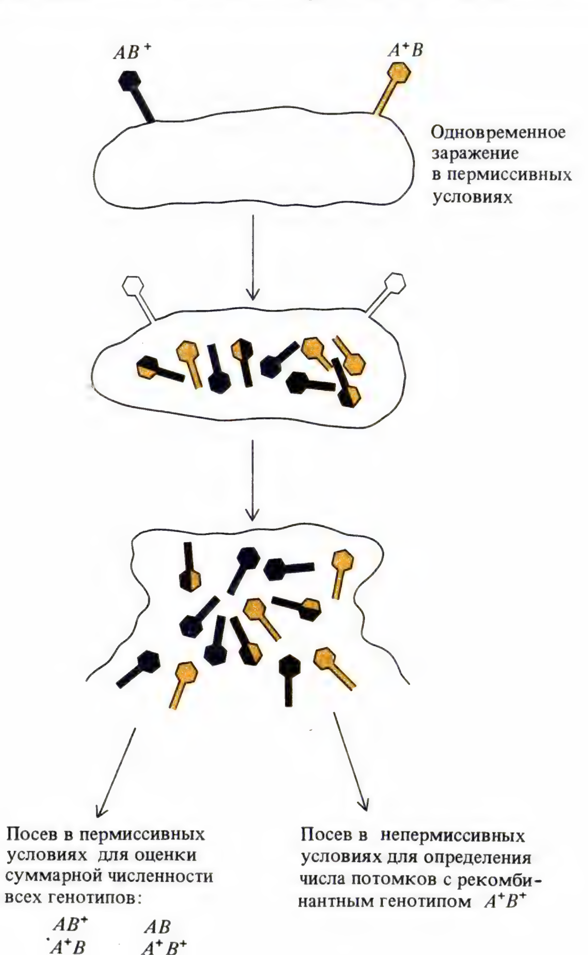


Рис. 6.2. Схема скрещивания двух мутантных фагов, *A* и *B*. Скрещивание осуществляют путем совместного заражения бактерии-хозяина в пермиссивных условиях.

риофагов. Клетки пермиссивного хозяина (штамма B) заражают двумя мутантами, затем подсчитывают общее число потомков при высеве на клетки штамма B и число rII^+-рекомбинантов. Для этого в качестве хозяина используют штамм K(λ). Так как реципрокные рекомбинанты, т.е. двойные мутанты *rII*, при этом не выделяются, то считают, что частота их появления совпадает с частотой рекомбинантов дикого типа. Поэтому при расчете расстояния на генетической карте число рекомбинантов дикого типа умножается на два:

$$\text{Генетическое расстояние} = \frac{2 \cdot \text{Число потомков типа } rII^+}{\text{Общее число потомков}} \cdot 100 \quad (6.1).$$

Природа мутаций в области *rII*

В модели структуры ДНК Уотсона и Крика предполагается, что замена одной нуклеотидной пары в нормальной нуклеотидной последовательности гена может привести к формированию мутантного фенотипа. Можно предположить, что мутация, в основе которой лежит замена одной нуклеотидной пары, должна обладать следующими свойствами: 1) обратные мутации, переводящие мутантный фенотип в нормальный, должны происходить примерно с той же частотой, что и прямые; 2) ей должна соответствовать определенная точка на генетической карте; 3) такая мутация должна обладать способностью к рекомбинации с любыми другими точечными мутациями, за исключением тех, которые представляют собой независимые замены той же нуклеотидной пары. Некоторые из изученных Бензером *rII*-мутантов обладали перечисленными свойствами, другие – нет. Данные, представленные в табл. 6.2, показывают, что частота обратных мутаций к дикому типу у различных *rII*-мутантов, способных к рекомбинации друг с другом, сильно различается. Некоторые из *rII*-мутантов вполне стабильны и не ревертируют к дикому типу (т.е. не дают бляшек на *E. coli* K(λ)); другие ревертируют к дикому типу с измеримыми и характерными частотами. Генетическая карта *rII*-мутантов, представленных в табл. 6.2, изображена на рис. 6.3.

Результаты рекомбинационного анализа более широкого набора из 60 независимо полученных *rII*-мутантов представлены на карте

Таблица 6.2. Характеристика восьми *rII*-мутантов фага T4

Мутант	Положение на карте	Частота реверсий
r47	0	$< 0{,}01 \cdot 10^{-6}$
r104	1,3	$< 1{,}0 \cdot 10^{-6}$
r101	2,3	$4{,}5 \cdot 10^{-6}$
r103	2,9	$< 0{,}2 \cdot 10^{-6}$
r105	3,4	$1{,}8 \cdot 10^{-6}$
r106	4,9	$< 1{,}0 \cdot 10^{-6}$
r51	6,7	$170 \cdot 10^{-6}$
r102	8,3	$< 0{,}01 \cdot 10^{-6}$

По *Benzer S.*, 1955. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **41**, 344.

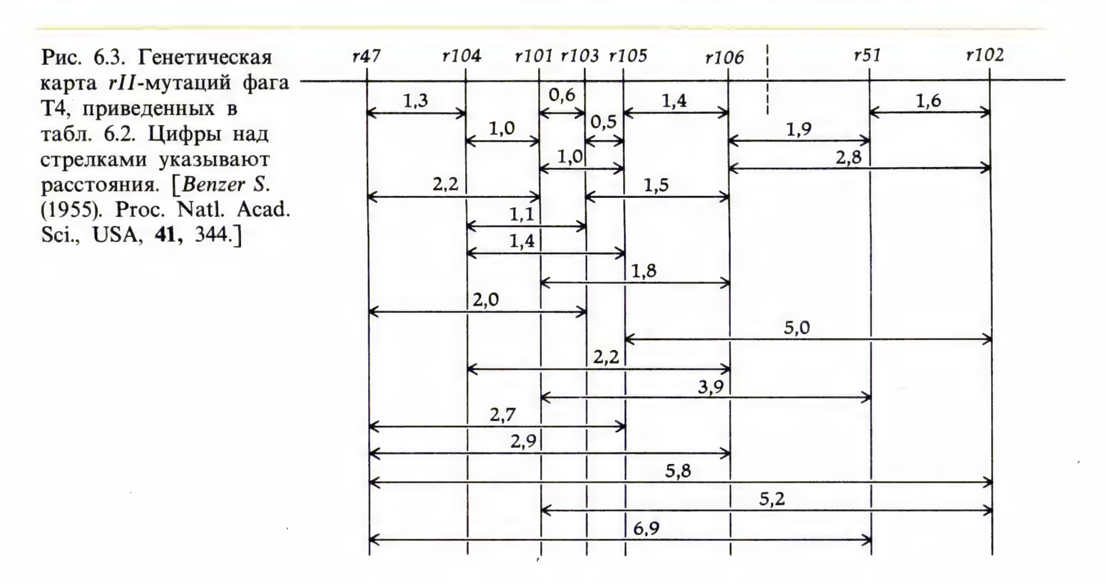


Рис. 6.3. Генетическая карта *rII*-мутаций фага T4, приведенных в табл. 6.2. Цифры над стрелками указывают расстояния. [*Benzer S.* (1955). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **41**, 344.]

Рис. 6.4. Карта тонкой структуры нескольких участков области *rII* фага T4. Числа между стрелками на картах участков *a*, *b*, *c* и *d* означают процент рекомбинантов дикого типа, возникающих при попарных скрещиваниях между мутантами. [*Benzer S.* (1955). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **41**, 344.]

(рис. 6.4). Тщательное изучение этой карты показывает, что некоторые из *rII*-мутантов (а именно не ревертирующие к дикому типу) рекомбинируют, давая rII^+ потомство не со всеми остальными *rII*-мутантами, но лишь с некоторыми из них. Соответственно эти мутации занимают на генетической карте участки большие, чем точечные мутации (размер участка зависит от конкретной мутации), и изображены жирными черными линиями, перекрывающими на карте мутации, с которыми они не рекомбинируют. Например, рассмотрим карту области *a* на рис. 6.4. Мутант *168* рекомбинирует с мутантами *295* и *312*, но ни один из этих трех мутантов не дает рекомбинантов дикого типа с мутантом *47*. Все эти четыре мутанта рекомбинируют с мутантами *145, 282* и *228*. Если мутанты *168* и *295* – это точечные мутации, то мутант *47* должен возникать в результате изменения более чем одной точки на генетической карте (т.е. изменения более чем одной нуклеотидной пары).

Относительно мутантов типа *47* было показано, что они представляют собой делеции многих последовательных пар нуклеотидов. Исследование рекомбинации двойных *rII*-мутантов показало, что такие мутации как бы вырезают из генетической карты участки, расположенные между фланкирующими генетическими маркерами, это неудивительно, поскольку у таких мутантов физически отсутствует участок ДНК между этими маркерами (рис. 6.5).

Из этих исследований был сделан важный вывод: фенотипически неразличимые *rII*-мутации могут быть следствием либо замены отдельной нуклеотидной пары, либо делеции некоторого числа пар нуклеотидов. Свойства, обнаруживаемые у таких делеций, нельзя считать неожиданными. Действительно, вряд ли утрата некоторого числа нуклеотидных пар может быть обратимым процессом, поскольку при этом должны восстанавливаться точное число и последовательность этих пар. Аналогично скрещивание между носителем такой делеции и штаммом с точечной мутацией, расположенной в участке, отсутствующем у партнера по скрещиванию, не должно приводить к появлению рекомбинантов дикого типа. Ни один из геномов, участвующих в таком

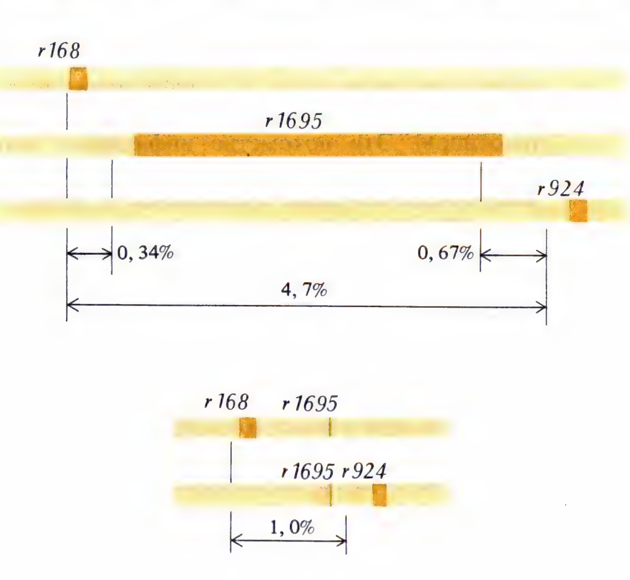


Рис. 6.5. Схема, иллюстрирующая механизм сокращения генетического расстояния между фланкирующими маркерами при скрещивании фаговых мутантов, несущих делецию в одном и том же участке. [*Nomura M., Benzer S.* (1961). J. Mol. Biol., **3**, 684.]

скрещивании, не содержит нужной нуклеотидной пары в месте точечной мутации. Следовательно, восстановление нуклеотидной последовательности дикого типа невозможно.

Функциональные особенности *rII*-мутаций

Генетический анализ состоит в экспериментальном изучении отношений, существующих между мутантами. Для определения характера этих отношений используются два основных приема – *рекомбинационный тест* и *тест на комплементацию*. Рекомбинационный тест, как мы уже отмечали в предыдущем разделе, определяет взаимное пространственное расположение мутаций на генетической карте. Комплементационный тест, с другой стороны, определяет функциональные отношения мутантов. Все *rII*-мутанты обладают одинаковым фенотипом (табл. 6.1). Одинаковы ли их генетические функции? Для ответа на этот вопрос клетки *E. coli* K(λ) заражали различными парными комбинациями мутантов *rII*, как это схематически изображено на рис. 6.6. Если в такой дважды инфицированной клетке возникает потомство фага, то это означает, что каждый из двух мутантных фагов осуществляет функцию, которую не в состоянии осуществлять второй мутант. Такие два мутанта называют комплементарными. С другой стороны, если в такой дважды инфицированной клетке потомства фагов не возникает, то это означает, что оба мутанта не способны осуществлять одну и ту же функцию.

Комплементационный анализ *rII*-мутантов легко проводится с помощью так называемого *spot-теста*. Клетки, инфицированные *rII*-мутантом с множественностью 0,1 (примерно один фаг на десять бактериальных клеток) смешиваются с теплым расплавленным агаром, и смесь наносится на поверхность питательной среды в чашке Петри. Когда агар затвердевает, на его поверхность капают несколько капель среды, содержащей другой *rII*-мутант. В месте падения капель некоторые клетки инфицируются обоими мутантами. Если при этом происходит комплементация, то в инфицированных клетках возникает потомство фагов обоих родительских генотипов (а также рекомбинантных генотипов). Это потомство инфицирует затем все остальные бактериальные клетки в покрытом каплей участке и убивает их. Таким образом, комплементация проявляется в лизисе бактерий на месте капли (рис. 6.7).

Результаты комплементационного теста показывают, что все *rII*-мутации, за исключением некоторых делеций, распадаются на две группы, обозначаемые как *A* и *B*. Следовательно, *rII*-фенотип может быть обусловлен утратой одной из двух генетических функций, *A* или *B*. Например, принадлежащий группе *A* мутант *104* не дает потомства при одновременном заражении с мутантами *47, 101* и *106* (рис. 6.4) и дает потомство при совместной инфекции с фаговыми мутантами из группы *B*, например *51* и *102*. Делеции, которые не могут быть отнесены ни к одной из этих групп, включают в себя на генетической карте границу между этими двумя группами комплементации и потому утрачивают обе функции.

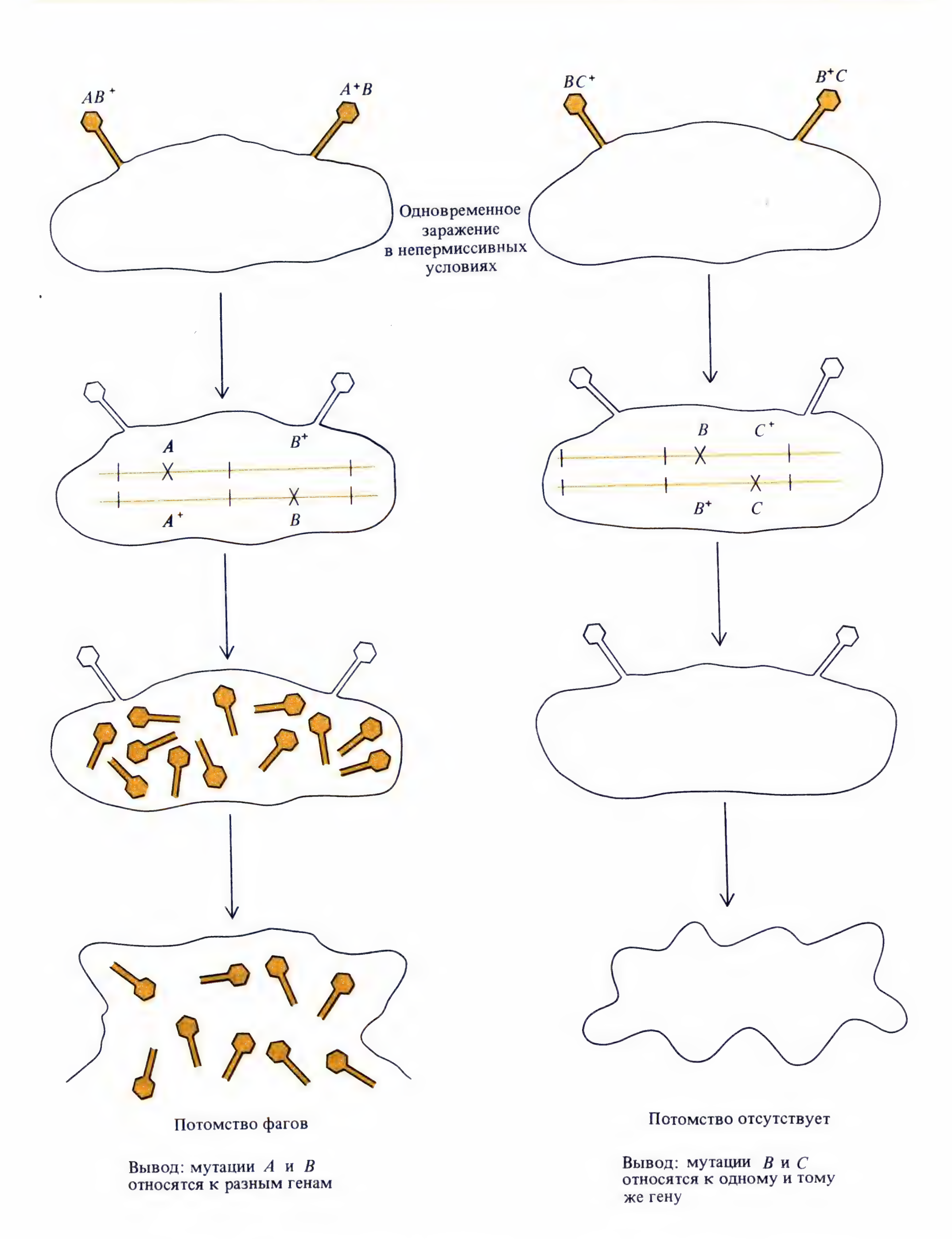


Рис. 6.6. Положительный (мутанты *A* и *B*) и отрицательный (мутанты *B* и *C*) ответы при постановке комплементационного теста между фаговыми мутантами.

Рис. 6.7. Комплементационный тест между парами *rII*-мутаций фага Т4. Пять прозрачных пятен указывают на комплементацию. В шестом секторе комплементации нет.



Цистрон

Использованный Бензером тест на комплементацию оценивает функциональные отношения между мутациями, находящимися в *транс*-конфигурации (рис. 6.8). Если две мутации принадлежат к одной группе комплементации и находятся в *транс*-положении, то они не комплементируют и потомства не возникает. С другой стороны, если эти же две мутации находятся в *цис*-положении, то потомство образуется. Например, если бактериальную клетку штамма K(λ) одновременно заражают двойным *rII*-мутантом и фагом Т4 дикого типа, то образуется потомство обоих генотипов. Фаг дикого типа осуществляет функции, необходимые для успешной репликации как генома дикого типа, так и мутантного генома. Если же две мутации относятся к разным группам комплементации, то и в *цис*-, и в *транс*-положениях они проявляют одинаковый фенотип: потомство возникает в обоих случаях.

Фенотипическое различие между *цис*- и *транс*-конфигурациями двух мутаций служит основой для генетического теста на общность функции, аналогичного *цис-транс*-тесту, впервые использованному Эдвардом Левисом при исследовании функциональных взаимоотношений псевдоаллелей различных генов дрозофилы. Например, мутации *Star*(*S*) и *asteroid*(*ast*) определяют форму и строение глаз дрозофилы. Первоначально считалось, что эти мутации аллельны, поскольку в мейозе они

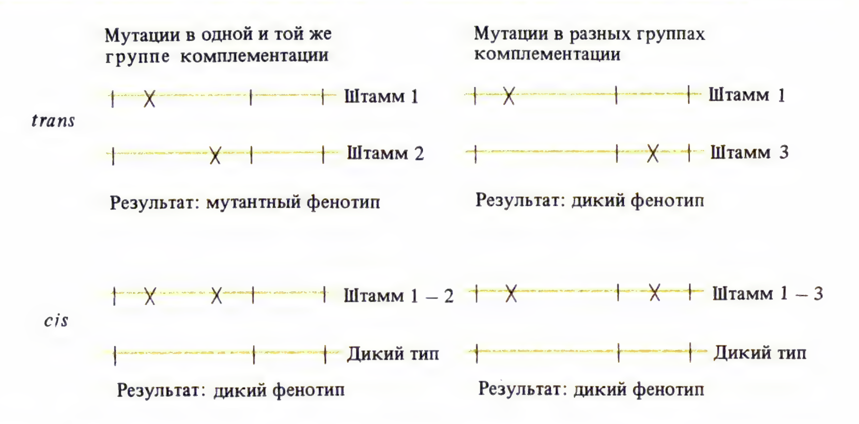


Рис. 6.8. *Цис-транс*-тест как пример комплементационного теста *rII*-мутантов. Если фенотипическое проявление пары исследуемых мутаций различно в *цис-* и *транс*-положениях, то эти мутации затрагивают одну и ту же генетическую функцию. Если же фенотипы тождественны, то затрагиваются разные генетические функции.

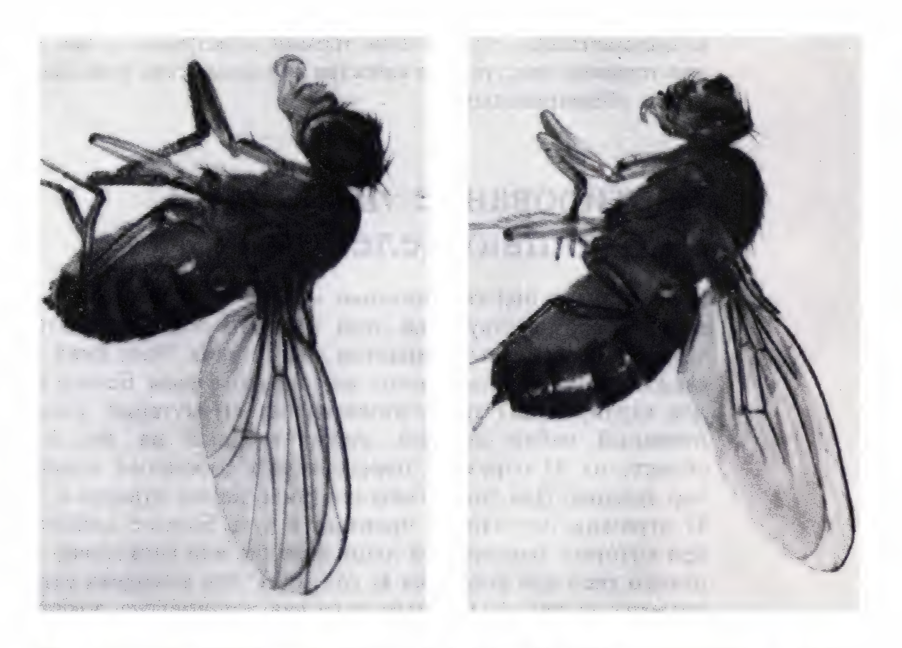


Рис. 6.9. Применение *цис-транс*-теста к двум мутациям дрозофилы, затрагивающим строение глаза: *Star* (*S*) и *asteroid* (*ast*). Гетерозигота *S*/ + обладает доминантным мутантным фенотипом, так как один ген дикого типа в диплоидном наборе не обеспечивает нормальную функцию. Слева изображена муха с генотипом *S ast*/ + +, справа – *S* + /*ast* +. Поскольку фенотипы, соответствующие двум указанным генотипам различны, можно сделать вывод, что эти мутации по-разному воздействуют на одну и ту же функцию. [*Lewis E. B.* (1951). Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **16,** 159.]

всегда расщеплялись. Мутация *ast* обозначалась как *star*-рецессивная (*s*), чтобы указать на ее аллелизм по отношению к *Star*-доминантной мутации (*S*). Однако тщательное исследование потомства от самок с генотипом *alSho*/ + *st*, подвергнутых возвратному скрещиванию с самцами *alsho*/*alsho*, показало, что изредка при этом могут возникать потомки дикого типа s^+. Частота возникновения таких особей составляет около 1 : 10 000, и во всех случаях они оказались рекомбинантными по фланкирующим (расположенным по обе стороны от этих мутаций) маркерам *al* (*aristaless*) и *ho*. Генотип таких особей + + *ho*/*alsho*. Существование такого рекомбинантного потомства свидетельствовало о том, что мутации *S* и *s* расположены в разных точках хромосомы, причем *S* слева от *s*. Чтобы отразить этот факт, пришлось *star*-рецессивную мутацию переименовать в *asteroid*. Однако, поскольку обе мутации оказывают сходное влияние на фенотип, вопрос об их функциональных отношениях оставался открытым. Для ответа на него были сконструированы генотипы, содержащие эти мутации в *цис*-(Sast/+ +) и *транс*-положении (*S* + *ast*). Оказалось что *цис*- и *транс*-конфигурации этих мутаций имеют разное фенотипическое проявление (рис. 6.9), следовательно, обе мутации влияют на одну и ту же генетическую функцию. Для обозначения таких функциональных отношений между очень тесно сцепленными мутациями был введен термин *псевдоаллелизм*.

Учитывая важность *цис-транс*-теста для определения функциональной генетической единицы, Бензер предложил для обозначения групп комплементации *rII*-мутаций термин «цистрон». С тех пор употребление термина «цистрон» в качестве синонима гена (как единицы функции) стало общепринятым.

Картирование *rII*-мутаций с помощью делеций

Известно, что при скрещивании мутантов со штаммами, несущими делеции в соответствующей этой мутации области генетической карты, нельзя получить рекомбинантов дикого типа. Этот факт дает в руки исследователей мощный метод анализа, которым Бензер воспользовался для картирования тысяч независимых *rII*-мутаций. Обдуманно упорядоченный набор делеций, представленный на рис. 6.10, делит *rII*-область на 47 отрезков, определяемых соседними концами различных пар делеций. Для того чтобы новую мутацию отнести к одному из этих 47 отрезков, достаточно произвести чуть больше десятка скрещиваний, при которых фиксируется лишь наличие или отсутствие рекомбинантов дикого типа при посеве на *E. coli* K (λ). Эта методика схематически изображена на рис. 6.11. После того как установлена локализация некоторого числа независимых *rII*-мутаций в определенном отрезке, остается установить лишь их взаимное расположение друг относительно друга, и нет необходимости определять их положение относительно мутаций, локализованных в других участках карты.

Построенная таким способом (рис. 6.12) карта тонкой структуры спонтанных *rII*-мутаций показывает, что эти мутации более или менее случайно разбросаны по генетической карте. Исключение составляют две «точки», представляющие собой высокомутабильные участки ДНК.

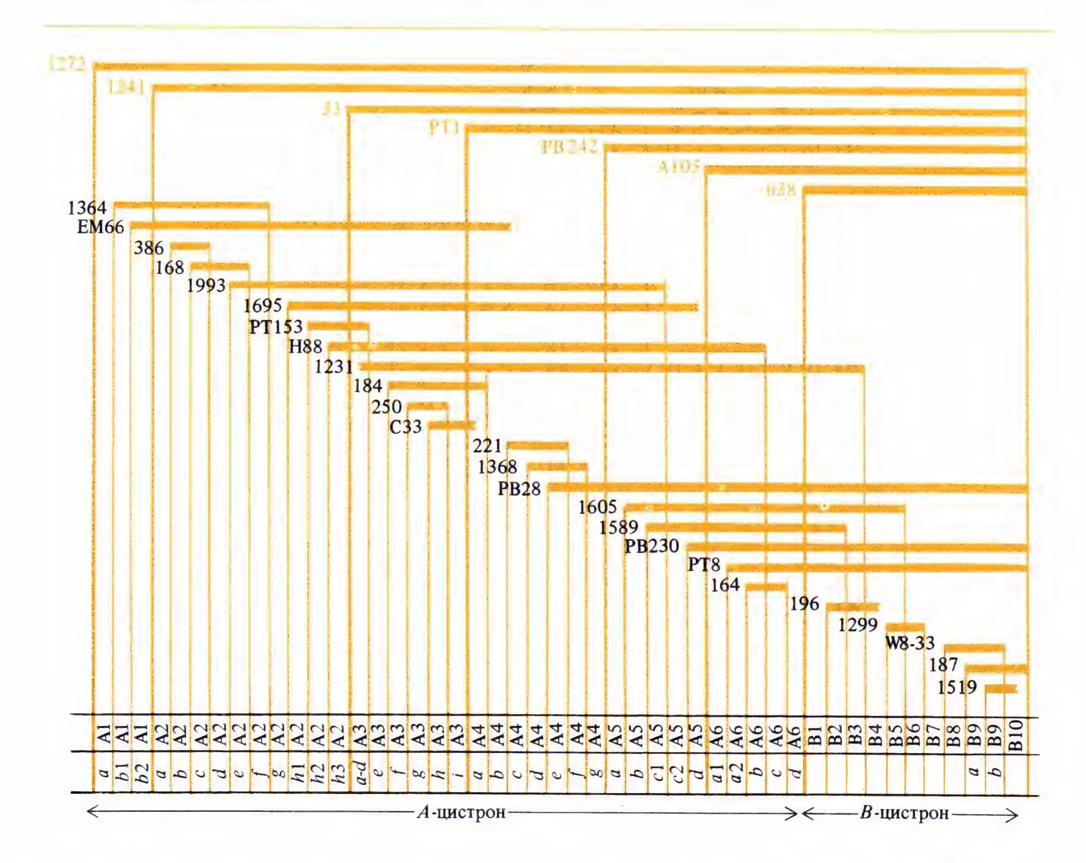


Рис. 6.10. Делеции, концы которых делят область *rII* на 47 сегментов. Семь больших делеций, изображенных в верхней части рисунка, позволяют разбить область на семь частей. Остальные делеции делят каждую из этих частей на более мелкие участки. Концы, обозначенные вырезом, не использовались при определении границ участков. Указаны границы цистронов *A* и *B*. [*Benzer S.* (1961). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **47**, 403.]

Эта карта демонстрирует важный факт, что *rII*-мутации, приводящие к утрате функции, т.е. к одному и тому же фенотипу, могут происходить во многих различных точках цистрона. Ясно, что число возможных аллелей *rII* очень велико. На реальность более глубокой дифференциации тонкой генетической структуры указывает тот факт, что спонтанные точечные мутации, расположенные в разных частях карты, ревертируют к дикому типу с различными и характерными для каждой мутации частотами. Следовательно, природа этих различных спонтанных мутаций, обусловливающих один и тот же фенотип, не может быть одинаковой. Сравнение карты спонтанных мутаций с аналогичной картой, построенной для мутаций, индуцированных специальными химическими мутагенами, показывает, что участки повышенной мутабильности в этих картах расположены в разных местах, хотя и специфичны для каждой из них (рис. 6.12). Это в свою очередь свидетельствует о существовании еще более тонкой структуры генетического материала. При картировании мутаций, полученных всеми возможными способами, установлена принадлежность 200 мутаций *rIIA*-цистрону

A

	1272	1241	J3	PT1	PB242	A105	638
A1	0	1	1	1	1	1	1

	1364	EM66
A1a	1	1
A1b1	0	1
A1b2	0	0

	1272	1241	J3	PT1	PB242	A105	638
A2	0	0	1	1	1	1	1

	1364	386	168	1993	1695	PT153	H88
A2a	0	1	1	1	1	1	1
A2b	0	0	1	1	1	1	1
A2c	0	0	0	1	1	1	1
A2d	0	1	0	1	1	1	1
A2e	0	1	0	0	1	1	1
A2f	0	1	1	0	1	1	1
A2g	1	1	1	0	1	1	1
A2h1	1	1	1	0	0	1	1
A2h2	1	1	1	0	0	0	1
A2h3	1	1	1	0	0	0	0

	1272	1241	J3	PT1	PB242	A105	638
A3	0	0	0	1	1	1	1

	PT153	184	250	C33
A3a-d	0	1	1	1
A3e	1	1	1	1
A3f	1	0	1	1
A3g	1	0	0	1
A3h	1	0	0	0
A3i	1	0	1	0

	1272	1241	J3	PT1	PB242	A105	638
A4	0	0	0	0	1	1	1

	184	221	1368	PB28
A4a	0	1	1	1
A4b	1	1	1	1
A4c	1	0	1	1
A4d	1	0	0	1
A4e	1	0	0	0
A4f	1	1	0	0
A4g	1	1	1	0

	1272	1241	J3	PT1	PB242	A105	638
A5	0	0	0	0	0	1	1

	1993	1605	1589	PB230
A5a	0	1	1	1
A5b	0	0	1	1
A5c1	0	0	0	1
A5c2	1	0	0	1
A5d	1	0	0	0

	1272	1241	J3	PT1	PB242	A105	638
A6	0	0	0	0	0	0	1

	H88	PT8	164
A6a1	0	1	1
A6a2	0	0	1
A6b	0	0	0
A6c	1	0	0
A6d	1	0	1

	1272	1241	J3	PT1	PB242	A105	638
B	0	0	0	0	0	0	0

	1231	1605	1589	196	1299	W8-33	187	1519
B1	0	0	0	1	1	1	1	1
B2	0	0	0	0	1	1	1	1
B3	0	0	1	0	1	1	1	1
B4	1	0	1		1	1	1	1
B5	1	0	1		0	1	1	1
B6	1	1	1		0	1	1	1
B7	1	1	1		1	1	1	1
B8	1	1	1		1	0	1	1
B9a	1	1	1		1	0	0	1
B9b	1	1	1		1	0	0	0
B10	1	1	1		1	1	0	

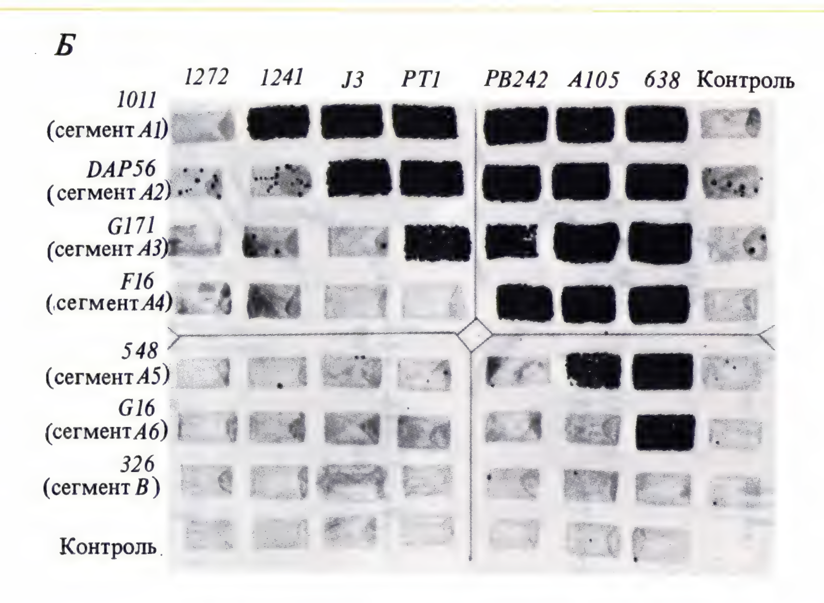
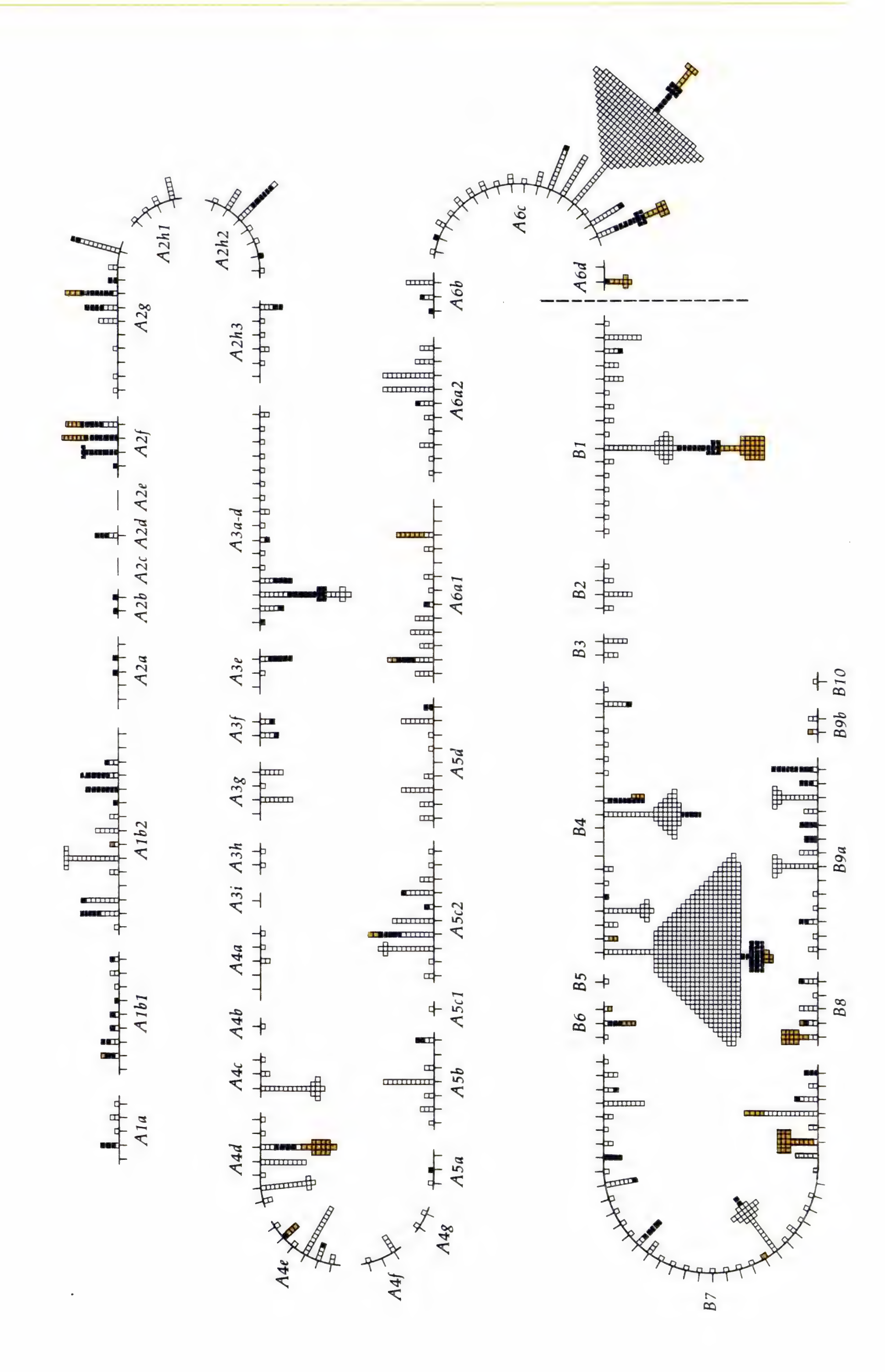


Рис. 6.11. *А*. Два последовательных этапа локализации новой *rII*-мутации в одном из 47 участков карты *rII*-области. Прежде всего мутант скрещивают со штаммами, несущими делеции «большой семерки», изображенной на рис. 6.10. Число 0 в горизонтальных прямоугольниках слева означает отсутствие выявленных рекомбинантов, число 1 – присутствие рекомбинантов. Число нулей определяет номер крупной части области, к которой принадлежит мутант. Затем мутант скрещивают с каждой из делеций, разбивающих большой сегмент, в которой он локализован, на более мелкие участки. Результаты, получаемые таким образом для различных мутантов, представлены в прямоугольниках, приведенных справа. Число нулей в строке в этом случае определяет более мелкий участок, которому принадлежит мутация. *Б*. Иллюстрация результатов, полученных при использовании метода быстрого выявления рекомбинантов дикого типа, предложенного Бензером. В начале опыта 0,5 мл культуры *E. coli* B (пермиссивного хозяина) заражают фагами двух линий: содержащей стандартную делецию и исследуемую мутацию. На каждую клетку при этом должно приходиться примерно по пять фаговых частиц. После того как время, необходимое для адсорбции фага пройдет, капли культуры наносят на полоски стерильной бумаги и раскладывают эти полоски на поверхности чашек, засеянных *E. coli* Kλ (рестриктивный хозяин). Если в инфицированных клетках возникли рекомбинанты дикого типа, то они заражают и лизируют клетки *E. coli* K(λ). В результате участок, покрытый полоской бумаги, становится прозрачным. Отрицательный результат означает, что доля рекомбинантов составляет менее 10^{-3} % от всего потомства фага. Появление нескольких прозрачных бляшек на месте пустой бумажки – следствие реверсии к дикому типу в результате точечной мутации. [*Benzer S.* (1961). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **47**, 403.]

и 108 мутаций *rIIB*-цистрону. В настоящее время известно, что протяженность *rIIA* составляет 1800 нуклеотидных пар, а *rIIB* – 850. Малое количество мутаций во многих участках карты и много меньшее общее число мутаций по сравнению с числом нуклеотидных пар наводит на мысль о том, что область *rII* еще далеко не до конца исследована. Кроме того, многие мутации могут оставаться невыявленными в силу того,


A1a
A1b1
A1b2
A2a
A2b
A2c
A2d
A2e
A2f
A2g
A2h1
A2h2
A2h3
A3a-d
A3e
A3f
A3g
A3h
A3i
A4a
A4b
A4c
A4d
A4e
A4f
A4g
A5a
A5b
A5c1
A5c2
A5d
A6a1
A6a2
A6b
A6c
A6d
B1
B2
B3
B4
B5
B6
B7
B8
B9a
B9b
B10

что возникающие при этом генетические изменения никак не проявляются фенотипически. Вырожденность генетического кода (см. гл. 12) означает, что замены некоторых пар нуклеотидов не приводят к заменам аминокислот в белках, кодируемых соответствующим цистроном. Ясно, однако, что число точек (сайтов) на карте области *rII*, мутации в которых приводят к изменению в фенотипе, составляет значительную часть от общего числа нуклеотидных пар в этой области.

Предельная разрешающая способность рекомбинационного анализа

Мутации *rII* дают возможность оценить предельную разрешающую способность рекомбинационного анализа. Как уже упоминалось выше, посев фага на *E. coli* K(λ) дает возможность выявить единственный рекомбинант дикого типа rII^+ из 10^6 *rII*-фаговых частиц. Следовательно, в соответствии с уравнением (6.1) теоретически минимальное расстояние между двумя соседними различимыми мутациями *rII* должно составлять 0,0002 ($2 \cdot 10^2/10^6 = 2 \cdot 10^{-4}$). Однако минимальное наблюдаемое на карте расстояние между соседними *rII*-мутациями составляет около 0,02 единиц (см. рис. 6.4). Меньшие расстояния не обнаружены, несмотря на высокую чувствительность системы. Эта оценка минимально возможного наблюдаемого расстояния между мутациями на карте хорошо соответствует получаемой из предположения, что минимальной единицей рекомбинации служит пара нуклеотидов. Хромосома фага T4 содержит $1{,}8 \cdot 10^5$ нуклеотидных пар и имеет длину 1500 единиц. Таким образом, величина 0,02 единицы соответствует приблизительно двум парам нуклеотидов. Поскольку это лишь грубая оценка, то естественно предположить, что к рекомбинации способны мутации, локализованные в соседних парах нуклеотидов. Это было убедительно подтверждено при исследовании карты тонкой структуры гена *trpA*. Следовательно, точечные мутации, не дающие при скрещивании рекомбинантов дикого типа, вернее всего представляют собой независимые изменения одной и той же пары нуклеотидов.

Уточнение генетической терминологии

Анализ тонкой структуры области *rII* позволяет дать строгие определения различным понятиям, ранее объединявшимся широким термином *ген*. Как уже говорилось выше, единица генетической функции была названа Бензером *цистроном* и определена с помощью *цис-транс*-теста; цистрон – это синоним гена. Единица генетической изменчивости, кото-

Рис. 6.12. Карта тонкой структуры области *rII*, построенная изображенным на предыдущем рисунке способом. Каждый белый квадратик соответствует независимой спонтанной мутации. Упорядочение последовательности мутаций внутри каждого из 47 участков основано на дальнейших скрещиваниях между этими мутантами. Отчетливо видны две главные «горячие точки» спонтанного мутирования. Каждый серый квадратик соответствует мутации, полученной под действием азотистой кислоты, а каждый цветной квадратик – мутация, индуцированная 5-бромурацилом. [*Benzer S.* (1961). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **47**, 403.]

рую Бензер назвал *мутоном*,– это минимальная единица цистрона, способная мутировать; мутон строго тождествен одной паре нуклеотидов в ДНК. Единица генетической рекомбинации, которую Бензер назвал *реконом*, также представляет собой пару нуклеотидов.

Теперь можно более точно определить также термин *аллель*. В каждой точке ДНК гена возможны четыре истинных аллеля AT, TA, GC, CG. Эти аллели никогда не рекомбинируют друг с другом (один из них можно принять в качестве дикого типа). Если внутри гена мутацией затрагиваются различные нуклеотидные пары, то две формы гена называются *гетероаллелями* (или псевдоаллелями). Гетероаллели могут рекомбинировать друг с другом, образуя новые рекомбинантные аллели (в том числе аллель, который может быть определен как дикий тип). Гетероаллели можно отличить друг от друга посредством рекомбинационного анализа. Однако комплементационный анализ, различающий лишь функциональные единицы, как правило, не дифференцирует гетероаллели и истинные аллели. Общее число истинных аллелей и гетероаллелей, возможное для данного гена, является функцией величины этого гена: если число пар нуклеотидов, составляющих ген, равно n, то число аллелей 4^n.

Комплементационный анализ у высших эукариот

С гетероаллельностью у высших эукариот мы впервые столкнулись в гл. 2 при обсуждении доминантности или рецессивности аллелей гена, определяющего окраску меха у кроликов. Комплементационный тест позволяет анализировать мутации, затрагивающие сложные фенотипы высших организмов. Рассмотрим две рецессивные мутации томатов: *dwarf* (d) (карликовость) и *pubescent* (p) (опушенность плодов). Нормальному фенотипу соответствует высокое растение с гладкими плодами. Являются ли эти мутации аллелями одного гена? A priori можно было предположить, что у этих двух мутантов затронуты различные генетические и физиологические функции. Для того чтобы определить, затрагивают ли d и p одну и ту же генетическую функцию, можно использовать комплементационный тест. При скрещивании гомозигот p/p с гомозиготами d/d потомство обладает нормальным фенотипом. Каждая родительская гамета привносит в зиготу один нормальный ген и один поврежденный. Генотип потомства должен иметь формулу dp^+/d^+p. Как мы и предположили вначале, d^+ и p^+ – различные гены.

В качестве другого примера рассмотрим две независимые рецессивные мутации дрозофилы, обнаруженные разными генетиками и названные *raspberry* (*ras*) и *prune* (*pn*) соответственно. Обе мутации сцеплены с полом и в гемизиготном и гомозиготном состоянии дают практически одинаковый фенотип: глаза темно-рубинового цвета. Для того чтобы определить, не тождественны ли эти мутации, можно использовать тест на комплементацию. При скрещивании самок *ras*/*ras* с самцами *pn*/*Y* у дочерей глаза были дикого типа. Следовательно, эти две мутации должны затрагивать различные генетические функции. Хромосома с мутацией *ras* одновременно может быть носителем аллеля pn^+, а хромосома с мутацией *pn* – носителем аллеля ras^+, поэтому в F_1

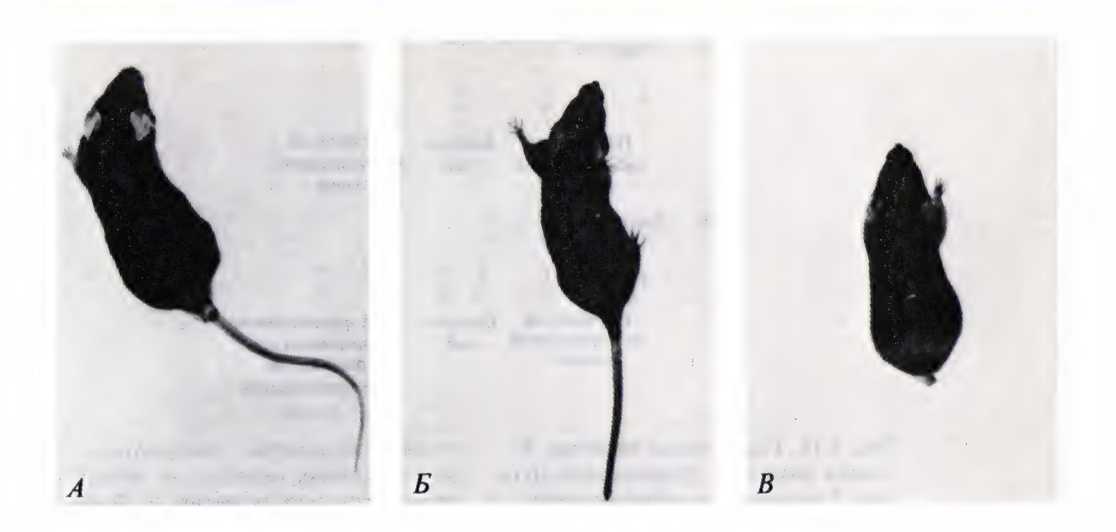


Рис. 6.13. Мыши с различными генотипами по *T*-локусу: *А*. + +; *Б*. *T* +; *В*. *T*/*t*. (Dr. *Yanagisawa Keiko*, *Mitsubishi-Kasei*, Institute of Life Sciences, Tokyo).

самки имеют генотип *pn* + / + *ras*, и эти две мутации могут быть названы комплементарными.

Напротив, сцепленные с полом рецессивные мутации *white* (*w*), *apricot* (*a*), *coffee* (*cf*) и *buff* (*bf*), также влияющие на цвет глаз, в гомозиготном и гемизиготном состоянии проявляются по-разному. При этом у самок, гетерозиготных по любой паре из этих мутаций, цвет глаз отличается от дикого типа. Следовательно, каждая из этих мутаций должна затрагивать одну и ту же генетическую функцию, но по-разному. Другими словами, эти мутации не комплементарны друг другу, т. е. являются аллелями одного гена (гена *white*), и поэтому для их обозначения используются символы w^a, w^{cf} и w^{bf}. Эти различные мутации гена w^+ могут служить примером множественного аллелизма (см. гл. 2). Рекомбинационное исследование этих мутаций мы обсудим в следующем разделе.

Тест на комплементарность особенно удобен при анализе рецессивных летальных мутаций. Комплементационный анализ оказался решающим методом при исследовании мутаций локуса *T* у мыши, поскольку многие из мутаций этого локуса подавляют рекомбинацию в участке хромосомы, в котором они находятся, делая таким образом рекомбинационный анализ невозможным. Доминантная мутация, называемая *Brachyrury* (*T*), возникает спонтанно в лабораторных линиях и легко выявляется, поскольку гетерозиготные мыши (*T*/ +) имеют короткий хвост. Гомозиготы (*T*/*T*) погибают на эмбриональной стадии развития. Вскоре после открытия этой мутации обнаружилось, что некоторые линии, обладающие близким к дикому типу фенотипом, являются носителями рецессивных мутаций, обозначенных буквой *t*. При скрещивании таких линий с гетерозиготами *T*/ + потомство получается бесхвостым (рис. 6.13). Эти *t*-мутации представляют собой рецессивные летали (рис. 6.14). Изображенное на рисунке скрещивание дает чистую линию *T*/*t*, поскольку, во-первых, лишь мыши с этим генотипом выжи-

А Родители $\frac{T}{t} \times \frac{T}{t}$

F_1 $\frac{T}{T}$ $\frac{T}{t}$ $\frac{t}{t}$

Погибает на эмбриональной стадии | Бесхвостый | Погибает на эмбриональной стадии

Б Родители $\frac{T}{t^x} \times \frac{T}{t^y}$

F_1 $\frac{T}{T}$ $\frac{T}{t^x}$ $\frac{T}{t^y}$ $\frac{t^x}{t^y}$

Погибает на эмбриональной стадии | Бесхвостый | Морфологически нормален или погибает на эмбриональной стадии

Рис. 6.14. Генетические свойства *T*-локуса мыши. *А*. Доминантная мутация *T* вызывает короткохвостость у мышей с генотипом $T/+$. Рецессивные аллели *t* вызывают бесхвостость у мышей с генотипами T/t. Как показывают скрещивания, и *T*, и *t* летальны в гомозиготном состоянии. Потомство, гомозиготное по этим генам, погибает на эмбриональных стадиях развития. *Б*. Функциональную тождественность различных *t*-аллелей *x* и *y* можно установить посредством указанного скрещивания, определяя фенотипы, соответствующие генотипам t^x/t^y.

вают и способны давать потомство в следующем поколении, а, во-вторых, *t*-мутации обычно «запирают» рекомбинацию, и этот генотип сохраняется из поколения в поколение. Чистые линии такого типа называются *сбалансированными леталями* и, с точки зрения генетика, очень удобны, поскольку, для того чтобы сохранить две мутации для будущих исследований, нет необходимости производить отбор в каждом поколении.

Таблица 6.3. Свойства некоторых рецессивных *t*-аллелей мыши

Группа комплементации	Аллели	T/t-фенотип	Рекомбинация
t^0	t^0, t^6, t^{30}, t^{h16}	Бесхвостый	Подавлена
	t^{h7}, t^{h13}	Нормальный	Подавлена
	t^{h18}	Короткохвостый	Повышена
t^9	t^4, t^9, t^{w18}, t^{w30}	Бесхвостый	Нормальная
t^{12}	t^{12}, t^{w32}, t^{w52}	Бесхвостый	Подавлена
t^{w1}	t^{w1}, t^{w3}, t^{w12}, t^{w20}, t^{w21}, t^{w71}, t^{w72}	Бесхвостый	Подавлена
t^{w5}	t^{w5}, t^{w6}, t^{w10}, t^{w11}, t^{w13}, t^{w14}, t^{w15}, t^{w16}, t^{w17}, t^{w37}, t^{w38}, t^{w39}, t^{w41}, t^{w46}, t^{w47}, t^{w74}, t^{w75}, t^{w80}, t^{w81}	Бесхвостый	Подавлена
t^{w73}	t^{w73}	Бесхвостый	Подавлена

По *Bennett D.* (1975). Cell, **6**, 441.

В географически сильно разобщенных природных популяциях мышей было обнаружено большое число *t*-мутаций. Комплементационный анализ рецессивных летальных *t*-мутаций, проводимый путем скрещивания различных сбалансированных линий (рис. 6.14), показал, что в некоторых комбинациях потомство жизнеспособно и обладает нормальными хвостами, в других гибнет на эмбриональной стадии. Известные летальные *t*-мутации распадаются на шесть групп комплементации (табл. 6.3). Гетерозиготные комбинации мутаций, относящихся к одной группе комплементации, летальны, тогда как двойные гетерозиготы по рецессивным леталям, относящимся к разным группам комплементации, жизнеспособны.

Рекомбинационный анализ тонкой структуры гена у высших эукариот: дрозофила

Картирование тонкой структуры гетероаллелей у высших эукариотических организмов выполнялось почти исключительно на *D. melanogaster*. Популярность этого генетического объекта объясняется легкостью культивирования мух и малой продолжительностью генерации. Выявление кроссинговера между гетероаллелями требует постановки тысяч скрещиваний и определения генотипов потомков, а это очень длительная и трудоемкая процедура. В некоторых случаях для выявления редких рекомбинантов может использоваться методика химического отбора, и тогда разрешающая способность рекомбинационного анализа приближается к достигаемой при использовании условно летальных систем у микроорганизмов.

Наиболее детально исследован у дрозофилы цистрон *rosy* (*ry*) – структурный ген, ответственный за синтез фермента ксантиндегидрогеназы (КДГ). Мухи, у которых этот фермент не работает (нуль-активные мутанты), легко определяются по красновато-коричневому цвету глаз, возникающему из-за отсутствия пигмента изоксантоптерина. Личинки, у которых отсутствует КДГ, очень чувствительны также к отравляющему действию пурина, при добавлении его в корм (рис. 6.15). Таким образом, использование корма, содержащего пурин, может служить способом выделения редких рекомбинантов дикого типа при скрещиваниях носителей различных КДГ нуль-гетероаллелей. Самки, гетерозиготные по двум гетероаллелям *rosy* (ry^x/ry^y), в большом количестве скрещиваются с самцами, гетерозиготными по двум другим гетероаллелям этого гена (ry^A/ry^B). Поскольку у самцов *D. melanogaster* рекомбинация не происходит, то гетерозиготы дикого типа в потомстве могут появляться лишь в результате рекомбинации между ry^x и ry^y и обладать одним из двух возможных генотипов: ry^+/ry^A или ry^+/ry^B. Активность КДГ у личинок, гетерозиготных по ry^+, достаточна для того, чтобы позволить им потреблять корм, содержащий пурин, без риска для жизни. Все остальное потомство, гетерозиготное по различным гетероаллелям *rosy*, погибает от пурина, добавляемого в пробирки с яичками сразу после того, как из этих пробирок удаляют родителей. Типичный эксперимент по выделению рекомбинантов дикого типа ставится сразу на не-

Пурины

А Пурин → Гипоксантин → Ксантин → Мочевая кислота

Птеридины

Б 2-Амино-4-гидроксиптеридин → Изоксантоптерин

Рис. 6.15. Химические превращения, катализируемые ксантиндегидрогеназой (КДГ). *А*. Обезвреживание токсичного пурина; *Б*. Образование изоксантоптерина – глазного пигмента дрозофилы. Обе реакции основаны на замене Н на ОН.

скольких сотнях содержащих пурин пробирках. Суммарную численность погибшего потомства можно оценить, оставив одну-две пробирки без пурина и подсчитав число мух в них. Полученная таким образом карта тонкой структуры КДГ-нуль-мутантов представлена на рис. 6.16. На карте, кроме того, указано положение нескольких чувствительных к пурину мутантов с низкой активностью КДГ, но с цветом глаз дикого типа. Изображено также положение нескольких электрофоретических вариантов фермента КДГ с измененной последовательностью аминокислот, но сохраняющих ферментативную активность.

Положение на карте точек (сайтов), соответствующих различным электрофоретическим вариантам, нельзя определить непосредственно, используя корм, содержащий пурин, поскольку все эти варианты обладают ферментативной активностью. Сначала получают КДГ-нуль-мутанты соответствующих вариантов этих генов, выделяя их по красновато-коричневому цвету глаз. Сайты этих нуль-мутаций различны для различных электрофоретических вариантов. Затем эти сайты используются как *неселективные маркеры* при скрещивании нуль-мутантов для выделения ry^+-рекомбинантов.

Молекула КДГ состоит из двух одинаковых полипептидных единиц по 160 000 дальтон каждая. Для кодирования полипептида такой длины требуется молекула ДНК, содержащая около 4500 пар нуклеотидов. Если предположить, что мутанты КДГ определяют общую длину соответствующего структурного гена (0,005 сМ), то 0,01 сМ = 9000 нуклеотидным парам (н. п.) ДНК. С другой стороны, эухроматиновая часть гаплоидного генома дрозофилы, в которую попадает подавляющее большинство всех картируемых генов, содержит примерно $1{,}5 \cdot 10^8$ н. п. при длине 275 сМ;

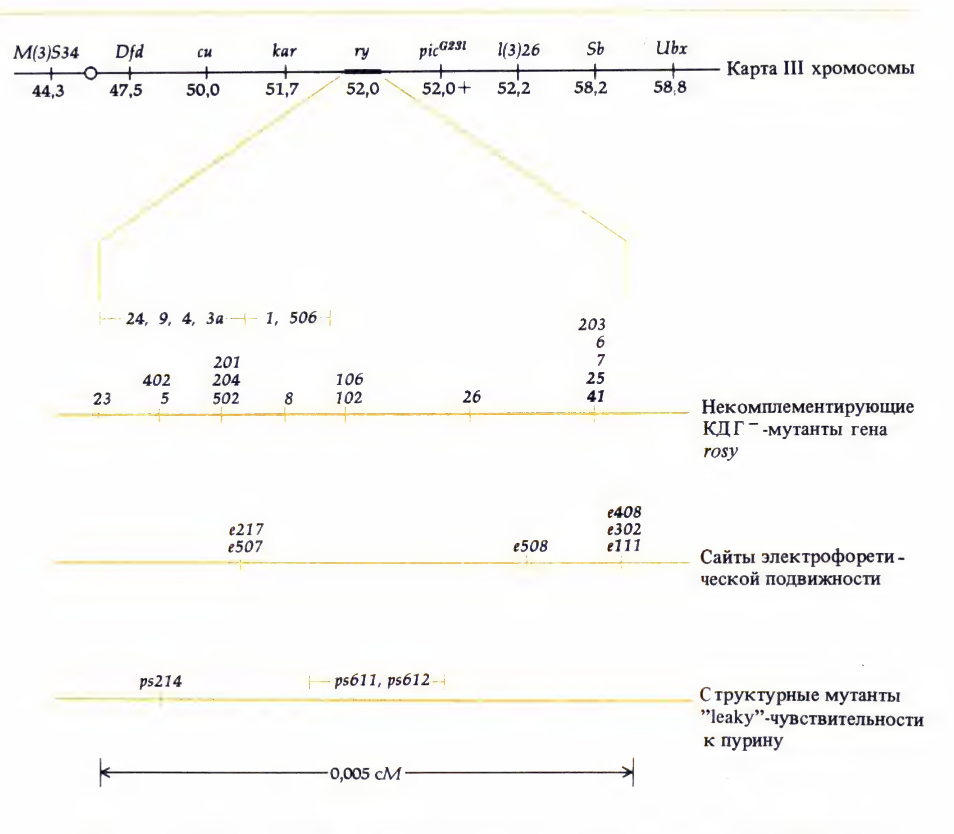


Рис. 6.16. Карта тонкой структуры гена *rosy* у *D. melanogaster*. [*Gelbart W.* et al. (1976). Genetics, **84**, 211.]

следовательно, 0,01 сМ = 5400 н.п. ДНК. Близость этих двух независимых оценок соотношения между масштабной единицей генетической карты и структурой ДНК свидетельствует о том, что разрешающая способность генетического анализа тонкой структуры гена у дрозофилы сравнима с достигаемой в генетике фагов и микроорганизмов.

Анализ тонкой структуры проведен для многих других генов дрозофилы даже в отсутствие специальных систем отбора, аналогичных пуриновой. Наиболее известен ген белоглазия (*white*), многочисленные мутации которого обусловливают различный цвет глаз в гомозиготном состоянии и в гетерозиготах с различными сочетаниями мутантных аллелей. Впервые описанный Морганом аллель w^1 необычен тем, что дает совершенно белые глаза. Некоторые из мутантных аллелей *white* перечислены в табл. 6.4.

Рекомбинационный анализ мутантов, представленных в табл. 6.4, позволил построить карту тонкой структуры, изображенную на рис. 6.17. Построение этой карты потребовало визуального определения фенотипа миллионов мух в потомстве от различных типов скрещивания. Картированные аллели локализуются в восьми различных сайтах, способных к рекомбинации. Все перечисленные в табл. 6.4 аллели рецессивны (за исключением двух: w^{Bwx} и w^{DZL}), и тест на комплементацию

Таблица 6.4. Некоторые мутантные аллели гена *white Drosophila melanogaster*

Аллель	Цвет глаз[1)]	Происхождение	Повреждение ДНК
w^{col}	Кирпично-красный	Индуцирован рентгеном	?
w^{Bwx}	Коричневый	Спонтанный	?
w^{cf}	Красновато-коричневый	Индуцирован рентгеном	?
w^{czz}	Оранжево-коричневый (морковный)	Спонтанный	?
w^{sat}	Темно-рубиновый	»	?
w^{65a25}	Бесцветно-белый	Индуцирован рентгеном	?
w^{bf1}	Светло-желтый	Спонтанный	Вставка
w^{a1}	Оранжево-коричневый (абрикосовый)	»	»
w^{a2}	Оранжево-коричневый	»	?
w^{a3}	Оранжево-коричневый	»	?
w^{a4}	Оранжево-коричневый	»	Вставка
w^{1}	Бесцветно-белый	»	»
w^{e}	Светлый желто-розовый (эозиновый)	»	»
w^{h}	Светло-желтый	»	»
w^{zm}	Красные точки на желтом фоне у самцов z^1w^{zm}	»	»
w^{sp1}			
w^{sp55}	Темно-желтый у самцов, светло-желтый у самок	»	»
	Яркие пятна на желтом фоне; у самцов – более темные	»	»
w^{sp2}	Такой же, как у w^{sp1}	»	Делеция
w^{sp3}	» »	Индуцирован рентгеном	»
w^{sp4}	» »	То же	»
w^{DZL}	Светло-желтый у самок; близкий к дикому типу у самцов	Спонтанный	Вставка

По *Zachar Z., Bingham P.M.* (1982). Cell, **30**, 529]

[1)] У мух дикого типа глаза интенсивно-красного цвета.

показывает, что все они влияют на функцию, определяющую нормальный цвет глаз. Однако при этом в гене *white* присутствует и некоторое функциональное разнообразие. Мутации, расположенные в правых сайтах (w^1 и w^{sp1}), действуют как доминантные супрессоры расположенного по соседству гена цвета глаз *zeste*, тогда как мутации пяти левых сайтов такого действия не оказывают. Механизм этой супрессии неизвестен.

Техника рекомбинантной ДНК позволила проанализировать тонкую структуру гена *white* методом рестрикционного картирования его ДНК.

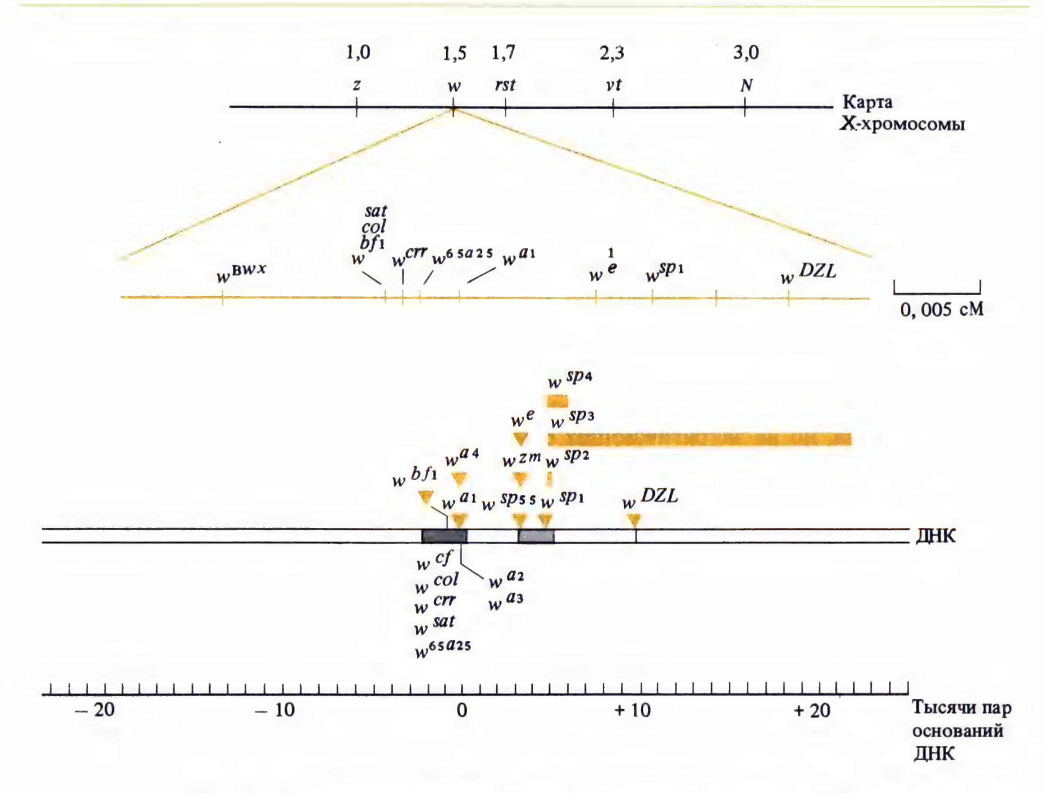


Рис. 6.17. Генетическая карта тонкой структуры и карта ДНК для гена *white Drosophila melanogaster*. Точкой отсчета на нижней шкале ДНК в нуклеотидных парах выбран элемент *copia*, вызывающий мутацию w^{a1}. [*Zachar Z., Bingham P. M.* (1982). Cell, **30,** 529.]

Эта методика будет описана в гл. 9, но сами результаты анализа можно изложить сейчас. Рестрикционный анализ ДНК многих мутантов, из числа представленных в табл. 6.4, позволяет определить делеции и вставки, превышающие размером 50 н. п. Более мелкие изменения, в том числе замены отдельных нуклеотидных пар, пока неразличимы. Как указывается в табл. 6.4, из 14 исследованных независимых спонтанных мутантов восемь содержат вставки больших участков ДНК и один (w^{sp2}) представляет собой делецию участка длиной не менее 100 н. п. Из пяти индуцированных рентгеновским облучением мутаций две оказались крупными делециями. Большинство мутаций, обусловленных вставками, если не все, связаны с присутствием *подвижных элементов* в последовательности дикого типа гена *white*. Подвижные элементы – это длинные последовательности нуклеотидов, встроенные в геномы практически всех эукариот и прокариот, и изредка способные случайно менять свою локализацию. Эти особенности мы обсудим в следующих главах. Одна из наиболее интенсивно исследовавшихся мутаций w^{a1} обусловлена вставкой элемента *copia*. Этот элемент представляет собой нуклеотидную последовательность длиной около 5000 н. п, включающую ДНК провируса РНК-ретровируса, инфицирующего дрозофилу.

Карта делеций и вставок в участке ДНК, соответствующем гену *white*, изображена на рис. 6.17. Как уже упоминалось, она складывается из двух функциональных областей. Левая область, включающая w^{a1}, и лежащие слева от нее мутации содержат много мутаций, качественно влияющих на пигментацию глаза. Считается, что этот участок кодирует некоторый пока еще неизвестный полипептид (или полипептиды), ответственный за пигментацию глаз. Все мутации в правой области сопряжены с сильными изменениями нормальной последовательности ДНК. Их фенотипическое действие лучше всего можно себе представить, считая, что они влияют на проявление (экспрессию) левой области гена *white*. Хотя граница между левой и правой областями четко не установлена, однако мы знаем, что область, кодирующая полипептид, и управляющая область содержат по крайней мере по 7000 н. п. или несколько больше. Исследование хромосомных перестроек, лежащих справа и слева, но не затрагивающих сам ген *white*, дают верхнюю оценку его размера – примерно 14 000 н. п. ДНК.

Анализ тонкой структуры гена *white* у дрозофилы и *rII*-генов фага Т4 показывает, что изучение фенотипических различий может служить мощным методом генетического анализа нуклеотидной организации ДНК. Изучение генетической организации началось с исследования тонкой структуры гена *white* за 40 лет до того, как стала известна химическая структура вещества наследственности. Детальный анализ генетической структуры, ставший возможным благодаря нашему пониманию структуры ДНК, предвещает грядущие в ближайшем будущем времена, когда тонкая структура гена может быть изучена в мельчайших деталях. Применение метода рекомбинантных ДНК к исследованию тонкой структуры гена *white* закрывает одну из самых ярких глав в истории генетики.

Литература

Bennet D. (1975). The T-locus of the mouse, Cell, **6,** 441–454.

Benzer S., 1961. Genetic fine structure. In: Harvey Lectures, Vol. 56, Academic Press, New York.

Gelbart W. et al. (1976). Extension of the limits of the XDH structural element in *Drosophila melanogaster*, Genetics, **84,** 211–232.

Green M. M. (1959). Spatial and functional properties of pseudo-alleles at the *white* locus in *Drosophila melanogaster*, Heredity, **13,** 302–315.

LeFever H. M. (1973). Analysis of three *white* mutants resulting in two new recombination sites at the *white* locus in *Drosophila melanogaster*, Drosophila Information Service, **50,** 109–110.

Zachar Z., Bingham P. M. (1982). Regulation of *white* locus expression: the structure of mutant alleles at the *white* locus of *Drosophila melanogaster*, Cell, **30,** 529–541.

Ключевые слова и понятия

Вирулентный фаг
Гетероаллели
Делеционное картирование
Комплементационный тест
Мутон
Непермиссивные (рестриктивные) условия
Пермиссивные условия
Псевдоаллель
Расстояние на карте
Рекомбинационный тест
Рекон
Сбалансированная леталь
Тонкая структура гена
Точечная мутация
Транс-конфигурация
Умеренный фаг
Условно летальная мутация
Цис-конфигурация
Цистрон
rII-система

Задачи

6.1. Обнаружено шесть новых мутаций фага Т4. С помощью комплементационного теста проведен попарный анализ всех мутаций. Результаты представлены в таблице. Знак «+» означает наличие прозрачного пятна (лизировавшие бактерии). Определите группы комплементации.

	1	2	3	4	5	6
1	−					
2	+	−				
3	−	+	−			
4	−	+	−	−		
5	−	−	−	−	−	
6	+	−	+	+	−	−

6.2. У дрозофилы существует много рецессивных мутаций, обусловливающих стерильность самок, в частности это мутации *dunce* и *diminutive*. Они сцеплены с полом и на карте расположены очень близко друг от друга. Продумайте постановку эксперимента, позволяющего определить, аллельны ли эти мутации.

6.3. Новая *rII*-мутация фага Т4 дает рекомбинанты дикого типа при скрещивании с *y3* (см. рис. 6.10), но не дает их при скрещивании с *1241*. Рекомбинанты дикого типа возникают также при скрещиваниях с *1993*, *1695*, *PT153* и *H88*, но не появляются при скрещивании с *386* и *168*. В каком участке карты *rII* локализована мутация?

6.4. *rII*-мутация, отобранная при длительном культивировании на среде, содержащей 5-бромурацил, дает рекомбинантов дикого типа при скрещивании с *638* (см. рис. 6.10). Кроме того, рекомбинанты дикого типа обнаруживаются в скрещиваниях с *1589* и *1299* и не обнаруживаются в скрещиваниях с *196*, *W8-33*, *187* и *1519*. Объясните результаты.

6.5. Картирование тонкой структуры с помощью делеций позволяет однозначно линейно упорядочить мутации. Отмечать при этом требуется лишь появление (или отсутствие) рекомбинантов дикого типа. В таблице представлены результаты попарных скрещиваний между

шестью *rII*-делециями; 1 означает появление рекомбинанта дикого типа при скрещивании, 0 – отсутствие. Постройте генетическую карту с указанием относительной длины каждой делеции. Какие из этих шести мутаций могли бы быть точечными и при этом результаты, представленные в таблице, не изменились?

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
1	0	0	0	1	0	0
2		0	0	0	1	0
3			0	0	1	1
4				0	1	1
5					0	1
6						0

6.6. Альбинизм у человека обусловлен гомозиготностью по аутосомному рецессивному гену. В Англии описан случай, когда у супругов-альбиносов родились трое детей с нормальной пигментацией. Этот факт можно объяснить по крайней мере двояко. Как?

6.7. *rII*-Делеции, с помощью которых Бензер разбил область *rII* на 47 участков, были выбраны им из много большего набора *rII*-мутаций (рис. 6.10). Как и в условии задачи 6.5, расположение этих делеций друг относительно друга можно было установить, проводя попарные скрещивания и отмечая лишь присутствие или отсутствие рекомбинантов дикого типа в потомстве. В таблице представлены результаты таких скрещиваний для 15 использованных Бензером неревертирующих мутаций. Постройте генетическую карту для этих мутаций. Считайте, что каждая мутация означает отсутствие одного определенного участка – другими словами, двойных мутаций в этой группе нет. (*Указание:* сначала определите порядок крупных делеций.)

	184	*215*	*221*	*250*	*347*	*455*	*506*	*749*	*782*	*882*	*A103*	*C4*	*C33*	*C51*	*H23*
184	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
215		0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
221			0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
250				0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
347					0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
455						0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
506							0	1	0	1	1	1	1	1	0
749								0	0	1	1	0	1	1	0
782									0	0	0	0	0	1	0
882										0	1	0	1	1	0
A103											0	1	1	1	0
C4												0	1	1	0
C33													0	1	0
C51														0	0
H23															0

6.8. Сбалансированные летальные линии сыграли большую роль в развитии генетики дрозофилы. Они сделали возможным конструирование *сбалансированных хромосом*, содержащих множественные инверсии, запирающие кроссинговер, рецессивные летали и гены стерильности самок, а также доминантные мутации, свидетельствующие о присутствии хромосомы в гетерозиготном состоянии. Так, например, Х-хромо-

сома, обозначаемая как FM7,– это сбалансированная хромосома, содержащая инверсии, мутацию женской стерильности и доминантную мутацию *Bar*(*B*), влияющую на форму глаз. Объясните, почему использование сбалансированной хромосомы позволяет неограниченно долго сохранять в X-хромосоме летальные и другие вредные мутации?

6.9. Мутации локуса *pan* у нейроспоры делают невозможным рост на среде, в которой отсутствует пантотеновая кислота, а мутанты по локусу *trp* могут культивироваться лишь в присутствии триптофана. Мутация *ylo* определяет желтый цвет спор (при нормальном черном). На основе представленных в таблице данных постройте карту, показывающую отношения между генами *ylo* и *trp* и различными мутациями локуса *pan*. Аскоспоры, полученные в этих четырех скрещиваниях, высевали на минимальную среду с добавлением лишь триптофана. Во всех скрещиваниях учитывали генотипы по неселективным маркерам среди рекомбинантов pan^+.

6.10. Отобраны шесть рецессивных летальных мутантов во второй хромосоме дрозофилы. Каждая линия сбалансирована SM1 (см. задачу 6.8) и маркирована доминантной мутацией *Curly*. Для того чтобы определить, являются ли какие-либо из этих леталей мутациями одного гена, были поставлены скрещивания типа l_A/Cy ♀ × l_B/Cy ♂.

В приведенной ниже таблице знак «+» означает появление в потомстве особей, не несущих признак *Cy*, знак «–» отсутствие таких особей. Мутациями скольких разных генов являются отобранные шесть леталей?

	l_1	l_2	l_3	l_4	l_5	l_6
l_1	–					
l_2	+	–				
l_3	–	+	–			
l_4	–	+	–	–		
l_5	+	+	+	+	–	
l_6	+	+	+	+	–	–

Скрещивание	Частота неселективных маркеров			
	$ylo\,trp^+$	ylo^+trp	$ylo\,trp$	ylo^+trp^+
$ylo^+pan18trp$ × $ylopan20trp^+$	0,084	0,053	0,067	0,796
$ylo^+pan20trp$ × $ylopan18trp^+$	0,033	0,052	0,710	0,105
$ylo^+pan20trp$ × $ylopan25trp^+$	0,160	0,200	0,100	0,54
$ylo^+pan25trp$ × $ylopan20trp^+$	0,080	0,270	0,520	0,130

6.11. У дрозофилы существует группа рецессивных летальных мутаций *Minute* (*M*), вызывающих замедленное развитие и утоньшение щетинок. При изучении мутаций *Minute* второй аутосомы самцов, гомозиготных по мутации *cinnabar* (*cn*), определяющей ярко-красный цвет глаз, подвергали рентгеновскому облучению и скрещивали с самками, у которых одна вторая хромосома несет сбалансированную леталь и маркирована доминантной мутацией *Curly* (*Cy*) (загнутые крылья), а вторая – доминантной мутацией *Brown* (*Bw*). Потомков с загнутыми вверх крыльями, у которых, кроме того, были тонкие щетинки, скрещивали, как показано ниже, для того, чтобы выделить линию мух, несущих индуциро-

ванные *Minute*:

P : cnM/Cy ♀ × Bw/Cy ♂
или cnM/Cy ♂ × Bw/Cy ♀
F_1 : cnM/Cy ♀♀ × cnM/Cy ♂♂

Каждое такое скрещивание давало линию, содержащую предполагаемую мутацию *Minute*. Истинные мутации *Minute* – рецессивные летали и идентифицируются по отсутствию гомозигот *cn* в потомстве от скрещивания F_1. В описываемом эксперименте было обнаружено 12 вновь индуцированных мутаций *Minute*, каждая в сбалансированной летальной линии. Для того чтобы определить, относятся ли эти мутации к одному или различным генам, был поставлен тест на комплементацию. Для этого попарно скрещивали различные линии (пронумерованные от 1 до 12) и наблюдали за появлением в потомстве жизнеспособных гомозигот *cn*. Результаты скрещиваний представлены в таблице; «+» означает присутствие в потомстве жизнеспособных гомозигот *cn*, «–» означает их отсутствие. Разбейте эти 12 мутаций на группы комплементации.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	–
2		–	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+
3			–	+	+	+	+	–	+	+	+	+
4				–	+	+	+	+	–	+	+	+
5					–	+	+	+	+	+	–	–
6						–	+	+	+	+	+	+
7							–	+	+	+	+	+
8								–	+	+	+	+
9									–	+	+	+
10										–	+	+
11											–	–
12												–

6.12. С помощью метода, схематически изображенного на рис. 6.2, определяли количество рекомбинантов между *rII*-мутантами *165* и *201*. При подсчете оказалось, что число фаговых частиц в пермиссивных условиях составляет 2000, а в непермиссивных – 50. Каково расстояние между *165* и *201* на генетической карте?

6.13. Самок, гетерозиготных по двум аллелям гена *white* (w^a/w^{bf}), скрещивали с самцами, гемизиготными по гену *white*. Из 100 000 самцов в потомстве от таких скрещиваний лишь два были с глазами дикого типа. Каково расстояние между w^a и w^{bf} на генетической карте?

6.14. Сцепленная с полом доминантная мутация Notch (*N*) выражается в зазубренности крыльев, утоньшении жилок крыла и мелких неправильностях щетинок. Кроме того, эта мутация рецессивная леталь. Рецессивные мутации *facet* (*fa*) и *split* (*spl*) вызывают нарушения на поверхности глаз, но легко отличимы друг от друга. У мух с генотипами fa/N и spl/N проявляются признаки, характерные для соответствующих рецессивных мутаций и для генотипа $N/+$; это означает, что *N*-мутантная хромосома не содержит аллелей fa^+ или spl^+. Рецессивные мутации *facet-notchoid* (fa^{no}) и *notchoid* (*nd*) вызывают такие же нарушения в развитии крыльев, как и *N*. У мух с генотипом nd/N крылья зазубрены очень сильно, а генотип fa^{no}/N почти полностью леталeн; *N*-мутантная хромосома не содержит аллелей nd^+ и fa^{no+}. На основе приведенных ниже данных постройте карту этого псевдоаллельного локуса. В таблицу включены данные лишь по двум из многих *N* аллелей.

Скрещивание	Рекомбинантные самцы	Общее число самцов
$\frac{y\,w\,spl\,sn}{+\,+\,fa^{no}\,+}$ ♀ × fa^{no} ♂	4$y\,w$ 2$fa^{no}\,spl\,sn$	9400
$\frac{y\,w\,fa^{no}\,sn}{+\,+\,fa\,+}$ ♀ × fa ♂	2$y\,w$ 1$fa\,fa^{no}\,sn$	8100
$\frac{y\,w\,spl\,sn}{+\,+\,fa\,+}$ ♀ × $y\,w\,spl\,sn$ ♂	4$y\,w$ $fa\,spl$ (не отличаются от родительских типов)	6100
$\frac{+\,nd\,rb}{w^a\,spl\,+}$	6$w^a\,spl\,nd\,rb$ 5 + + + +	38 900
$\frac{w^a\,N^{N1c}\,+}{+\,spl\,rb}$	3 + + + +	42482
$\frac{y\,N^{g11}\,+}{+\,spl\,rb}$	12y + + rb	41 041

По *Welshons W.* (1958). Proc. Natl. Acad. Sci USA, **44**, 254.
По *Welshons W., Halle Van E.* (1962). Genetics, **47**, 743.

6.15. Как измерить частоту рекомбинаций между *r168* и *r924* при скрещивании *r168r1695* × *r1695r924* в ситуации, схематически изображенной на рис. 6.5? (Необходимо использовать простой и быстрый способ скрещивания, изображенный на рис. 6.11. Считайте, что вы располагаете линиями с единичными *rII*-мутациями, а также двойными мутантами.)

6.16. Мутации нейроспоры am^2 и am^3 делают ее неспособной к росту на среде без глицина или содержащей его в концентрации, меньшей 0,02 М. Этим можно воспользоваться в качестве инструмента для отбора рекомбинантов дикого типа, образующихся при скрещивании двух мутантных линий. Результаты скрещиваний представлены ниже; *inos* и *sp* – фланкирующие маркеры. Что можно сказать по результатам скрещивания?

Скрещивание	Число различных генотипов по фланкирующим маркерам в аскоспорах am^+				Число аскоспор am^+	Учтенное число живых аскоспор, тыс.	Частота аскоспор am^+ на 10^6 живых аскоспор
	sp^+inos	$spinos$	sp^+inos	$spinos^+$			
$am^2 \times am^2$	—	—	—	—	0	456	—
$am^3 \times am^3$	—	—	—	—	0	585	—
$am^2 \times am^3$	—	—	—	—	14	651	21,54
$spam^2inos^+ \times sp^+an^2inos$	0	0	0	0	0	209	—
$spam^2inos^+ \times sp^+am^3inos$	0	6	0	17	23	1549	14,85
$sp^+am^2inos \times spam^3inos^+$	0	8	7	9	24	1214	19,77
$spam^2inos \times sp^+am^3inos^+$	6	9	6	5	26	881	29,45
$sp^+am^2inos^+ \times spam^3inos$	7	4	2	4	17	1148	14,80
Итого:					104	5443	19,11

7

Геном вируса

Вирусы – это сложные нуклеопротеины, использующие метаболический аппарат зараженной ими клетки для собственного размножения. Многие бактериофаги (например, Т4), вирусы растений и животных убивают инфицированные клетки в процессе размножения. Другие вирусы не разрушают полностью инфицированную клетку, а позволяют ей расти и делиться, производя и выделяя наружу потомство вирусов. Третьи, подобные бактериофагу λ и обезьяньему вирусу 40 (SV40), могут встраиваться в геном хозяина и пассивно реплицироваться по мере роста и деления клетки (т. е. переходить в состояние провируса).

Исследование вирусов, особенно бактериальных, внесло огромный вклад в наше понимание генетических явлений. Быстрое размножение бактериофагов дает возможность за одни сутки производить скрещивания в потомстве двух последовательных поколений. Аналогичные скрещивания на дрозофиле требуют 3,5 недель, а на кукурузе – по меньшей мере года. Кроме того, огромная численность фаговых популяций, содержащихся в нескольких миллилитрах культуральной жидкости, дает возможность наблюдать очень редкие генетические события. Малый размер геномов многих фагов по сравнению с геномом бактерий, например *E. coli*, позволяет идентифицировать все или по крайней мере большинство фаговых генов и весьма подробно представить себе генетическую организацию и регуляцию генома в целом. Геном фага φX174 состоит всего из девяти генов, геном фага лямбда – менее чем из 60, тогда как геном *E. coli* насчитывает, вероятно, несколько тысяч генов. Сочетание этих замечательных достоинств сделало вирусы незаменимыми генетическими объектами и привело к тому, что геномы некоторых бактериофагов изучены в настоящее время лучше, чем каких бы то ни было иных организмов. Они могут служить моделями при анализе строения и работы более сложных геномов.

Размножение бактериофагов

Жизненный цикл фага T4 стал классическим примером онтогенеза вирусов. Эксперимент, впервые проведенный Эмори Эллис и Максом Дельбрюком, позволил установить общую последовательность событий. Растущие клетки *E. coli* заражали фагом T4 так, что в среднем на одну клетку приходилось по одной фаговой частице. В течение двух-трех минут инкубации большинство фагов адсорбировалось на клетках. Все неадсорбировавшиеся фаги затем инактивировали, добавляя антифаговую сыворотку. Через несколько минут после этого культуру разбавляли в несколько сот раз питательной средой для того, чтобы понизить концентрацию антител и предупредить инактивацию фагового потомства. Через определенные промежутки времени в пробах инфицированной культуры определяли концентрацию инфицирующих единиц, высевая на чашки с индикаторными бактериями и подсчитывая число стерильных пятен (негативных колоний) на газоне. Результаты графически представлены на рис. 7.1, *А*. В течение первых 24 мин после прикрепления фага к клетке число инфицирующих единиц в культуре оставалось постоянным. В этот период каждая негативная колония образовывалась отдельной инфицированной клеткой, из которой потомство фага выходило после того, как клетка оказывалась на поверхности агара. По прошествии этих 24 мин число инфицирующих единиц в культуре начинает

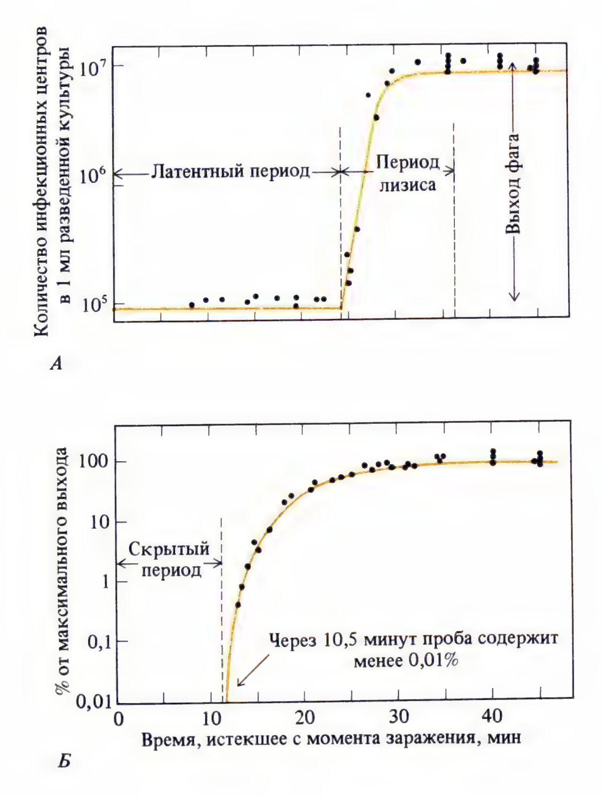


Рис. 7.1. Жизненный цикл фага T4. *А*. Одиночный цикл развития фага T4. *Б*. Внутриклеточное развитие фага T4. [По *A. H. Doermann*, (1952). J. Gen. Physiol., **35**, 645.]

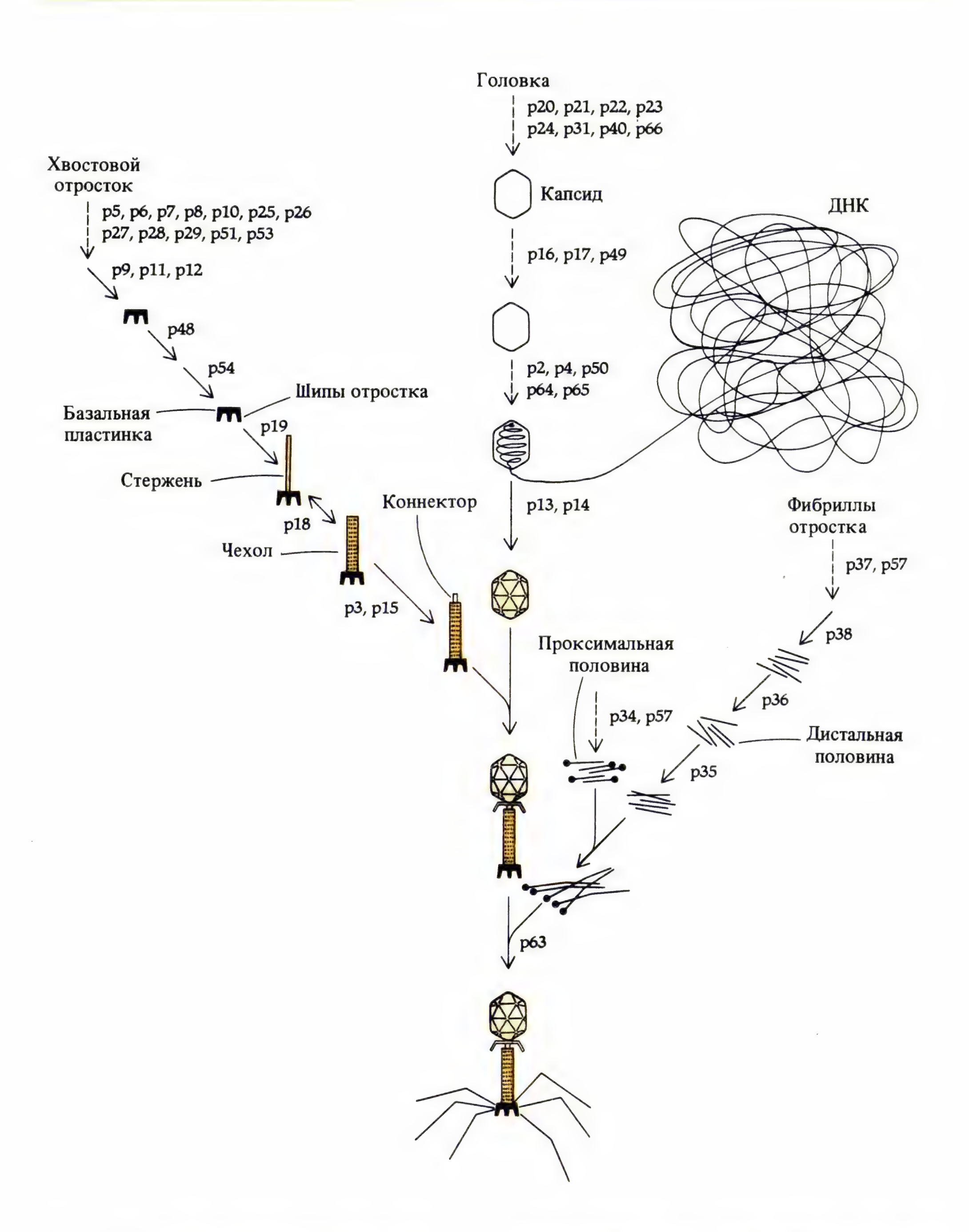


Рис. 7.2. К сборке фаговых частиц ведут четыре независимые цепи событий, сливающиеся в самом конце этого процесса. Числами указаны продукты фаговых генов, о которых известно, на каком именно этапе они функционируют. [*Wood W. B.* (1973). In: Genetic Mechanisms of Development (F. H. Ruddle, ed.), Academic Press, New York.]

расти, поскольку некоторые клетки лизируются и высвобождают содержащиеся в них фаги. К 30-й мин почти все инфицированные клетки уже разрушены. Число инфицирующих единиц к концу эксперимента примерно в 100 раз превышает число инфицированных клеток. Из каждой клетки выходит около 100 потомков фага.

Ясно, что существенные для размножения фага Т4 события происходят в течение латентного периода (рис. 7.1, *А*), предшествующего высвобождению потомства из инфицированных клеток. Количество фаговых частиц внутри клеток можно определить, искусственно лизируя инфицированные клетки в различные моменты латентного периода. Результаты такой процедуры представлены графически на рис. 7.1, *Б*. Обратите внимание на то, что в первые 10–11 мин после адсорбции родительских фагов на бактериальной клетке инфицирующих единиц в клетках не обнаруживается вовсе. Этот промежуток называется скрытым периодом. Даже родительские фаги в зараженных клетках утрачивают инфицирующую способность. По прошествии 11 мин в некоторых клетках начинают появляться фаговые частицы, способные заражать бактериальные клетки, и к 14-й мин в каждой клетке содержится в среднем по одной фаговой частице. Затем число таких фагов внутри клеток быстро растет в оставшееся до конца латентного периода время и достигает насыщения в период лизиса клеток. Этот эксперимент показывает, что фаги не просто делятся, как это делают бактерии; механизм их размножения был раскрыт в эксперименте Херши—Чейза, описанном в гл. 4.

Морфогенетические события, происходящие в скрытом периоде, были исследованы посредством наблюдения инфицированных клеток под электронным микроскопом и методами генетического анализа (рис. 7.2). На рисунке видно, что существуют четыре отдельные последовательности событий, которые все вместе приводят к сборке фага. Во-первых, репликация родительской ДНК инфицировавшего клетку фага приводит к наработке пула ДНК фага Т4. Во-вторых, ДНК управляет синтезом многочисленных белков, необходимых для морфогенеза головки фага (капсида), хвостового отростка и его нитей (фибрилл).

Синтез головки фага завершается упаковкой в нее молекулы ДНК. Затем к головке прикрепляется уже собранный отросток. И наконец, к отростку крепятся нити, и сборка фага завершена. Изображенная на рис. 7.2 детальная последовательность событий на каждом этапе была расшифрована посредством генетического анализа мутаций, влияющих на развитие фага Т4. В этой главе мы расскажем о том, как генетический анализ помогает понять устройство и работу вирусного генома.

Мутантные бактериофаги

Как уже говорилось в предыдущей главе, лишь немногие фаговые гены имеют мутации, изменяющие морфологию негативных колоний. С другой стороны, очевидно, что во всех существенных для размножения генах фага, могут происходить летальные мутации, делающие невозможным появление фагового потомства. Мутанты, не жизнеспособные

13–1215

Таблица 7.1. Фенотипы *sus*-мутантов фага в бактериях с различными генотипами

Генотип фага	Генотип бактерии-хозяина[1]			
	Su^-	Su^+_{amber}	Su^+_{ochre}	Su^+_{opal}
Дикий тип	+	+	+	+
sus_{amber}	−	+	+	−
sus_{ocher}	−	−	+	−
sus_{opal}	−	−	−	+

[1] «+» потомство есть, «−» потомства нет.

в одних условиях и развивающиеся нормально в других, называются *условно летальными.* Они могут быть размножены и исследованы. В генетике фагов важны два основных типа условно летальных мутантов.

Первый тип – это *температурочувствительные мутанты* (*ts*). Большинство фагов способно инфицировать хозяина и размножаться в широком интервале температур. Температурочувствительные мутанты многих фагов *E. coli* способны размножаться при 30°С (пермиссивные условия), но теряют эту способность и обнаруживают свой мутантный фенотип при температуре 40–42°С (непермиссивные условия). При такой температуре негативные колонии не образуются. Известны также мутанты, чувствительные к холоду (*cs*). Появление температурной чувствительности почти всегда свидетельствует о том, что в каком-то участке ДНК, кодирующем некоторый белок, произошла мутация, повлекшая за собой аминокислотную замену. В результате белок становится нестабилен при непермиссивной температуре и утрачивает активность.

Второй тип условно летальных мутантов – *супрессорчувствительные* мутанты (*sus*). Фаги с мутацией *sus* могут размножаться при инфицировании бактериальных клеток с геном супрессора Su^+, т. е. в пермиссивных условиях, но не в состоянии размножаться при инфицировании клеток других штаммов, не содержащих гена супрессора (Su^-), т. е. в непермиссивных условиях. Фаг дикого типа размножается в клетках обоих типов (табл. 7.1). Супрессорчувствительные мутации в отличие от мутаций специфичности к хозяину не влияют на способность фага адсорбироваться. Такой фаг нормально прикрепляется к поверхности бактерии, вводит в нее свою ДНК и даже может убить клетку-хозяина, но не способен к размножению. Существуют три класса супрессорчувствительных мутаций, *amber*(*am*), *ochre*(*och*) и *opal*(*op*). Здесь мы лишь упомянем о них как о генетических маркерах. Они могут затрагивать все гены, кодирующие синтез белков. Мутация нарушает синтез белка в клетках хозяина типа Su^-, но не препятствует синтезу белка в клетках типа Su^+. Биохимическую природу этих мутаций и механизм супрессии мы обсудим в гл. 12.

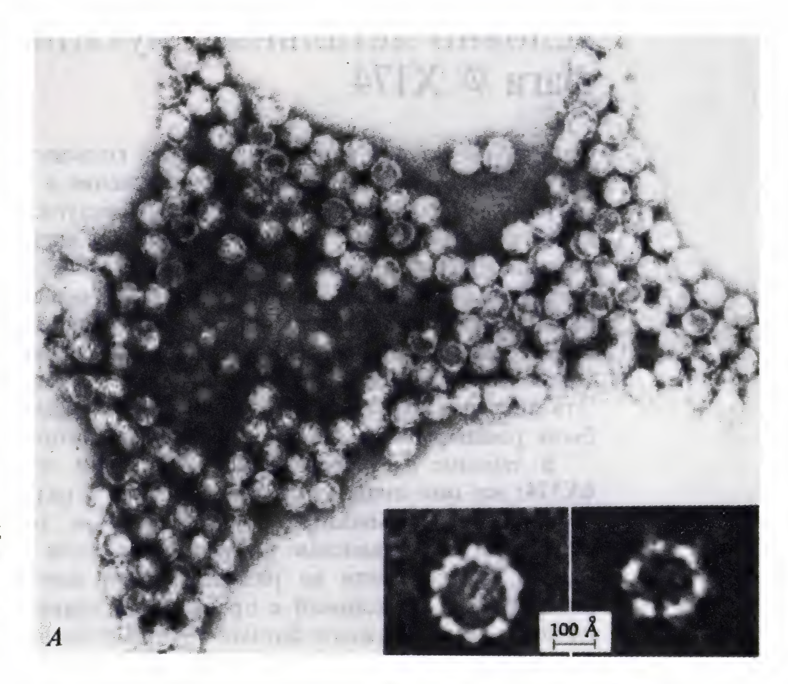
После этого краткого обзора различных типов мутантных фагов вернемся к генетическому анализу фаговых мутаций. Это позволит нам понять организацию генома вирусов.

Комплементационный анализ условно летальных мутаций фага ⌀ X174

Фаг фX174 – мелкий вирус, содержащий кольцевую одноцепочечную молекулу ДНК (рис. 7.3). После проникновения в клетку-хозяина синтезируется комплементарная цепь ДНК и образуется двухцепочечная молекула, которая затем в начале скрытого периода реплицируется по полуконсервативному механизму. После того как нарабатывается достаточное количество белков головки и начинается сборка фагов, ДНК начинает реплицироваться посредством видоизмененного *сигма*-механизма, при котором синтезируется только фаговая цепь, и в головку фагов включаются одноцепочечные кольцевые молекулы фаговой ДНК. Эта последовательность необходимых для размножения фага событий была расшифрована посредством генетического анализа.

В таблице 7.2 перечислены 39 условно летальных мутаций фага фX174; все они лишают фаг способности к размножению при инфицировании в непермиссивных условиях. Для того чтобы определить, влияют ли две независимо возникшие мутации на одну и ту же генетическую функцию или на разные, можно использовать комплементационный тест, описанный в предыдущей главе. Бактериальные клетки одновременно заражают фагами обоих мутантных типов при непермиссивных условиях, например при температуре 42°C, если оба мутанта чувствительны к температуре. Если в таких дважды инфицированных бактериальных клетках потомство фагов возникает, можно сделать вывод, что каждый фаг осуществляет функцию, которую не может осуществить другой (см. рис. 6.6). Такие две мутации называются комплементарными и относятся к разным генам. Выполняемый таким образом тест на комплементацию полностью аналогичен описанному в гл. 6 для мутантов эукариот. Возникает как бы «диплоидная» инфицированная клетка, в которой хромосома каждого фага несет по одной мутации, и наблюдается «диплоидный» фенотип, т. е. потомство фага либо возникает, либо нет. Заметим, что для выполнения теста на комплементацию нам не надо определять генотип фагового потомства.

Комплементационный анализ перечисленных в табл. 7.2 мутантов показывает, что они относятся к восьми различным группам комплементации. Так, например, при заражении непермиссивных бактерий фагами *am10* (цистрон *D*) и *am9* (цистрон *G*) их клетки лизируются, и, следовательно, потомство фагов возникает. Напротив, при заражении непермиссивного хозяина фага *am9* и *am32* потомство не возникает, и, следовательно, эти две мутации относятся к одной и той же группе комплементации (цистрон *G*). Если считать, что частота возникновения мутаций во всех генах примерно одинакова, то из факта, что в большинстве групп комплементации локализовано по нескольку мутаций, по-видимому, следует, что все эти мутации в совокупности затрагивают все важные гены фX174. Другими словами, исследовано достаточное количество независимых мутаций для построения генетической карты. Далее мы увидим, что такое разделение на группы комплементации правильно отражает (за единственным исключением) механизм биохимического функционирования фага.



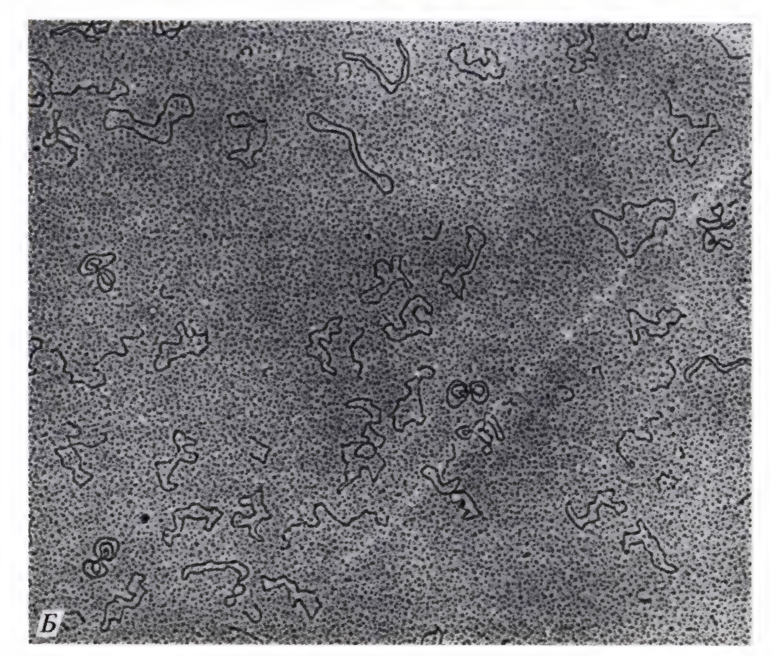


Рис. 7.3. *А*. Электронная микрофотография фаговых частиц φX174 (× 190 000). Внизу справа – фрагменты фотографии, на которых видна организация субъединиц капсида. (*Jeffrey Tromans*, Dr. *Robert W. Horne*, the John Innes Institute, Norwich, England.). *Б*. Электронная микрофотография ДНК фага φX174 в одноцепочечной и репликативной двухцепочечной форме (× 21 000). Двухцепочечные молекулы на фотографии имеют вид более толстых и менее извитых нитей по сравнению с одноцепочечными. (Dr. *Richard Junghans* and Professor *Norman Davidson*, California Institute of Technology.)

Таблица 7.2. Классификация мутантов фага φX

Цистрон	Мутанты
A	*am 8, am 18, am 30, am 33, am 35, am 86, ts 128*
B	*am 14, am 16, och 5, ts 9, ts 116, och 1, och 8, och 11*
C	*och 6*
D	*am 10, am H81*
E	*am 3, am 6, am 27*
F	*am 87, am 88, am 89, am H57, op 6, op 9, tsh 6, ts 41D*
G	*am 9, am 32, ts γ, ts 79*
H	*am N1, am 23, am 80, am 90, ts 4*

По *Benbow R.M.* et. al. 1971. J. Virol., **7**, 549.

Рекомбинационный анализ мутантов фага ∅ X174

Когда фаги с различными мутантными генотипами заражают клетку, в которой они могут размножаться, то в потомстве обнаруживаются фаги как с родительскими, так и с рекомбинантными генотипами. Скрещивание между двумя различными *ts*-мутантами фага выполняют при пермиссивной температуре (30°C), а скрещивание между *sus*-мутантами фага – в клетках Su^+-штамма. Суммарное число потомков всех генотипов определяют, высевая на чашки определенный объем культуры в пермиссивных условиях. Количество рекомбинантов дикого типа легко определить посевом такой же пробы в непермиссивных условиях, когда негативные колонии образуют лишь фаговые частицы дикого типа (см. рис. 6.2), точно так же, как это было с *rII*-мутантами фага Т4.

Скрещивание фагов не вполне аналогично скрещиванию эукариотических организмов. Мы знаем, что при скрещивании двух эукариотических родителей 1) генетический вклад каждого родителя в потомство одинаков (это обеспечивается мейозом) и 2) если генетические маркеры не сцеплены, то в потомстве возникает равное число родительских и рекомбинантных генотипов. При скрещивании фагов, однако, относительный генетический вклад родителей в потомство, как было установлено, зависит от относительного числа родительских фагов каждого типа в данной инфицированной бактериальной клетке. Например, если отношение численностей родительских фагов с генотипами *A* и *B* равно $A/B = 10/1$, то часто обнаруживается, что число рекомбинантных потомков превосходит число потомков родительского типа В. При скрещивании фагов число родительских генотипов может быть больше двух. Если одна и та же клетка заражена фагами с тремя различными генотипами *A*, *B* и *C*, то в потомстве некоторые фаги будут обладать рекомбинантным генотипом *ABC*. Ясно, что динамика скрещивания фагов более сродни проблемам популяционной биологии, чем проблемам индивидуального скрещивания организмов, обладающих мейозом. Совокупность родительских геномов фагов, инфицирующих клетку, пред-

Таблица 7.3. Частоты рекомбинаций, наблюдаемые при двухфакторных скрещиваниях мутантов фага фX174

Мутант	*A*					*B*		*C*	*D*	*E*		*F*		*G*	*H*	
	am18 (A)	*am33 (A)*	*am35 (A)*	*am50 (A)*	*am86 (A)*	*am14 (B)*	*am16 (B)*	*och6 (C)*	*am10 (D)*	*am3 (E)*	*am6 (E)*	*am88 (F)*	*op6 (F)*	*am9* G	*am23 (H)*	*amN1 (H)*
A																
am18(A)																
am33(A)	21.9 ±3.2 (2)†															
am35(A)	0.4 ±0.1	21.2 ±2.4†														
am50(A)	7.9 ±0.5†	4.5 ±0.6†	13.9 ±1.0†													
am86(A)	11.7 ±2.4†	5.5 ±2.0 (2)†	16.8 ±1.5†	0.5 ±0.1 (2)												
B																
am14(B)	2.8 ±0.3	11.3 ±0.4†	2.8 ±0.3	2.6 ±0.5 (2)	4.0 ±0.2											
am16(B)	2.0 ±0.1	9.1 ±2.8†	2.7 ±0.1	6.4 ±0.3	7.3 ±1.2	1.3 ±0.3										
C																
och6(C)	1.3 ±0.2	3.9 ±0.4	0.7 ±0.1	2.2 ±1.3	1.1 ±0.1	1.0 ±0.2	1.3 ±0.3									
D																
am10(D)	1.4 ±0.5	6.2 ±1.0	2.0 ±0.5	4.0 ±0.6 (2)	4.2 ±0.2	1.8 ±0.2 (2)	2.3 ±0.4	2.0 ±0.2								

E															
am3(E)	4.1 ±0.6 (2)	10.8 ±0.8 (3)	4.2 ±1.0 (3)	10.2 ±1.6 (3)	8.3 ±0.9 (2)	3.4 ±0.5 (4)	4.6 ±0.9 (5)	1.3 ±0.1 (2)	1.5 ±0.2 (3)						
am6(E)	6.6 ±1.0	5.7 ±0.8	6.3 ±1.2	8.3 ±2.0	6.5 ±2.0 (2)	2.4 ±0.7	3.5 ±0.4	0.2 ±0.7	0.2 ±0.4	0.2 ±0.4 (6)					
F															
am88(F)	10.8 ±1.2	12.4 ±2.1	11.9 ±0.3	8.0 ±1.0	5.3 ±0.9	10.3 ±0.7	9.3 ±3.2	11.1 ±2.2	14.4 ±0.6	4.4 ±0.8 (2)	7.1 ±0.7 (2)				
op6(F)	6.5 ±0.2		6.0 ±0.2	4.2 ±1.5	1.3 ±0.6	4.8 ±0.4	5.3 ±0.7		2.2 ±0.1	1.2 ±0.1	2.5 ±0.4				
G															
am9(G)	5.8 ±1.4 (2)	11.5 ±0.8	8.0 ±1.0 (2)	8.2 ±0.8	6.8 ±0.4	2.9 ±0.9	5.4 ±1.2	1.2 ±0.1	5.9 ±2.1	6.8 ±0.8 (9)	4.7 ±1.0	1.3 ±0.2			
H															
am23(H)	1.7 ±0.8 (2)	2.0 ±0.4	4.7 ±0.5	1.2 ±0.1	0.4 ±0.1	1.8 ±0. (3)	2.1 ±0.4 (2)		2.6 ±0.3	2.2 ±0.6 (2)	3.4 ±0.9	3.4 ±0.4	9.2 ±1.4	2.1 ±0.3	
amN1(H)	3.0 ±0.3	7.5 ±1.2	3.1 ±0.2	2.0 ±0.3 (2)	2.1 ±0.3 (2)	3.0 ±0.5	2.8 ±0.5	1.4 ±0.2	4.6 ±0.3 (2)	8.1 ±1.3 (3)	6.2 ±0.9 (2)	4.1 ±0.6	8.1 ±0.5	3.1 ±0.8 (2)	0.26 ±0.3 (2)

* Приводимые значения $\times 10^4$.

+ Только эти частоты рекомбинаций цистрона *A* использовались при построении рисунка 14.19. Числа в скобках означают количество повторностей независимого определения частоты рекомбинации; приводится среднее значение.

По *Benbow R. M.* et. al. (1971). J. Virol., 7, 549.

ставляет собой популяцию-основателя. Эти геномы реплицируются и рекомбинируют с другими геномами, обладающими теми же или отличными генотипами. Рекомбинантные генотипы реплицируются наряду с родительскими, и при лизисе зараженной клетки освободившиеся фаговые частицы представляют собой выборку геномов из общего генофонда, содержащегося в клетке в момент упаковки ДНК в головки фагов. Кроме того, не все реплицирующиеся геномы родительского типа с равной вероятностью рекомбинируют с геномами других родительских типов. Например, такая ситуация имеет место, если фаг с генотипом *A* исходно адсорбировался на одном конце длинной бактерии, а фаг с генотипом *B* – на другом. Исключение некоторых геномов из фонда скрещивания приводит к низкой *отрицательной интерференции* (*c* несколько больше 1), наблюдаемой в большинстве скрещиваний между фагами. Причина этого явления состоит в том, что геномы, входящие в фонд скрещивания, т. е. уже участвовавшие в одном акте рекомбинации, имеют больший шанс принять участие и во втором рекомбинационном событии по сравнению с произвольным геномом, который может вовсе не входить в фонд скрещивания.

Хотя механизмы скрещивания у фагов и у эукариотических организмов различны, тем не менее понятия, используемые в генетике эукариот, могут быть применены и к скрещиванию между фагами. Для этого необходимо контролировать проникновение фаговых частиц каждого из двух родительских генотипов в инфицированные клетки и время, отводимое на репликацию и рекомбинацию. Когда эти два фактора контролируются, то есть скрещивание осуществляется в определенных стандартных условиях, то можно определить сцепление между генетическими маркерами и оценить частоту рекомбинации, что позволяет строить генетические карты.

Отношения между перечисленными в табл. 7.2 мутациями фага фX174 анализировали посредством двухфакторных и трехфакторных скрещиваний. Двухфакторные скрещивания между супрессорчувствительными мутантами осуществляли следующим образом: культуру бактерий Su^+ заражали двумя мутантными штаммами фага с высокой множественностью (по 5 фаговых частиц каждого типа на бактериальную клетку). Использование такой множественности дает нам уверенность в том, что все клетки инфицируются обоими фагами. После лизиса бактерий по числу негативных колоний на индикаторной культуре, обладающей соответствующими Su^+-генами, определяли общее число фагов в потомстве. При скрещивании фаговых мутантов sus_{amber} в качестве хозяина использовали штамм Su^+_{amber}; при скрещивании между sus_{amber}- и sus_{opal}-мутантами или между sus_{amber} и sus_{ochre} индикатором служил бактериальный штамм с обоими генами Su^+. Число рекомбинантов дикого типа, возникающих при скрещивании, определяли по числу негативных колоний на индикаторной культуре Su^-, на которой могли размножаться только фаги дикого типа. Частоты рекомбинации, обнаруженные при скрещивании между этими мутантами фага фX174, представлены в табл. 7.3.

Для того чтобы определить, в каком порядке расположены описанные мутации на генетической карте, использовали трехфакторные скрещивания. При этом применялся метод, несколько отличный от описанного для трехфакторных скрещиваний в гл. 5, поскольку в этом случае было необходимо отбирать рекомбинантов дикого типа по двум

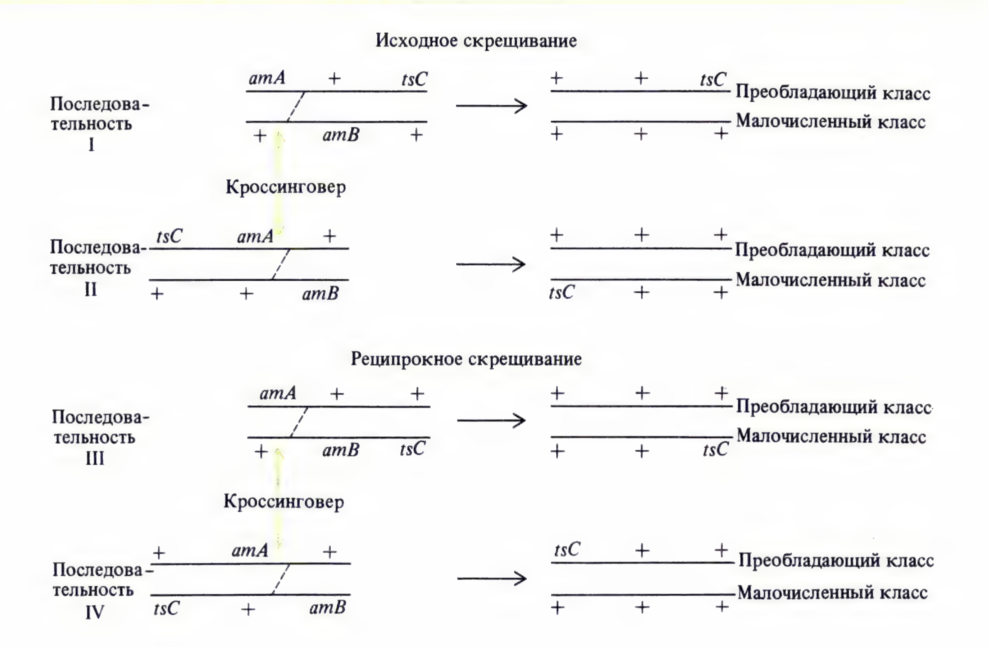


Рис. 7.4. Пример использования слабосцепленного неселектируемого маркера при определении последовательности маркеров путем трехфакторного фагового скрещивания. I и II – две возможные последовательности расположения трех маркеров. Отбирают рекомбинантов дикого типа между *amA* и *amB*, а затем по генотипу в отношении неселективного маркера определяют правильную последовательность. Например, если гены расположены в последовательности I, то большинство отобранных рекомбинантов дикого типа будет обладать генотипом + + *tsC*. Для появления рекомбинантов с генотипом + + + необходим двойной кроссинговер, и потому такие рекомбинанты встречаются реже. Если же гены расположены в последовательности II, то частоты двух рекомбинантных генотипов будут обратными. Для того чтобы подтвердить правильность установленной последовательности генов, производят реципрокное скрещивание.

маркерам. В описанной ранее ситуации никакого отбора в потомстве не производилось и могли наблюдаться все восемь возможных комбинаций генотипов. Рассмотрим изображенное на рис. 7.4 скрещивание *amAtsC* × *amB*. Если *amA* и *amB* сцеплены друг с другом теснее, чем каждый из них с *tsC*, что устанавливается в двухфакторных скрещиваниях, то *tsC* используют в качестве *неселектируемого* маркера при анализе потомства от скрещивания на Su-индикаторе при пермиссивной температуре. Потомки дикого типа в отношении аллелей *amber* будут формировать негативные колонии независимо от того, содержит их генотип *tsC* или соответствующий аллель дикого типа. Доля фагов, несущих аллели *tsC* и tsC^{+} среди рекомбинантов, позволяет различить последовательности генов *amAamBtsC* и *tsCamAamB*. Если в потомстве представлен преимущественно дикий тип, значит, гены расположены в последовательности *tsCamAamB*. Если же большинство составляют температурочувствительные фаги, значит, порядок расположения генов на карте *amAamBtsC*. Последовательность, установленная таким скре-

Таблица 7.4. Частоты рекомбинации, наблюдаемые при трехфакторных скрещиваниях мутантов фX174*

Скрещивание	Частота рекомбинации (селективные маркеры)	*wt* (%) (неселективные маркеры)	Преобладающий генотип (неселективные маркеры)	Порядок генов *H G F E D C B A H G*
1. *amN1 tsγ × ts79*	1.2 ± 0.4	33	*am*	N1—79—γ
2. *amN1 ts79 × tsγ*	0.8 ± 0.3	90	*wt*	N1—79—γ
3. *am88 tsγ × ts79*	1.0 ± 0.7	97	*wt*	79—γ–88
4. *am88 ts79 × ts4*	1.8 ± 0.4	96	*wt*	4–79——88
5. *am88 ts79 × op6*	13.4 ± 3.7	91	*wt*	79——88—6
6. *am88 ts79 × am9*	1.4 ± 0.3	38	*ts*	79—9–88
7. *am3 ts79 × tsγ*	0.7 ± 0.1	25	*am*	79—γ———3
8. *am3 tsγ × ts79*	0.9 ± 0.2	88	*wt*	79—γ———3
9. *am88 ts79 × am3*	3.0 ± 0.3	99	*wt*	79——88——3
10. *am3 tsγ × am88*	4.3 ± 0.5	46	*ts*	γ–88——3
11. *am3 tsγ × op6*	1.2 ± 0.1	43	*ts*	γ——6–3
12. *am3 tsγ × am27*	0.3 ± 0.2	95	*wt*	γ———3–27
13. *am3 ts9 × am27*	0.3 ± 0.2	37	*ts*	3–27————9
14. *am3 ts9 × ts116*	2.3 ± 0.4	16	*am*	3————116—9
15. *am33 ts116 × ts9*	1.5 ± 0.3	39	*am*	116—9–33
16. *am33 ts116 × am50*	4.5 ± 0.6	89	*wt*	116——33–50
17. *am33 ts116 × am86*	7.1 ± 2.2	77	*wt*	116——33–86
18. *am33 ts4 × am16*	9.7 ± 1.5	95	*wt*	16–33——4
19. *am33 ts79 × tsγ*	1.0 ± 0.4	79	*wt*	33———79—γ
20. *am33 tsγ × amN1*	8.3 ± 1.1	34	*ts*	33——N1——γ
21. *am9 ts128 × amN1*	3.0 ± 0.3	7	*ts*	128—N1—9
22. *am33 tsγ × am86*	6.0 ± 0.8	43	*ts*	33–86———γ
23. *am9 ts128 × am88*	1.6 ± 0.3	99	*wt*	128———9—88

24. *am88 ts79* × *och6*	10.8 ± 2.3	93	*wt*	79—88—6
25. *am3 tsγ* × *och6*	1.4 ± 0.3	95	*wt*	γ—3—6
26. *am3 ts9* × *och6*	1.0 ± 0.4	45	*ts*	3—6—9
27. *am3 och8* × *och6*	Low burst[+]	4	*am*	3—6—8
28. *am3 och11* × *och6*	Low burst	6	*am*	3—6—11
29. *am3 och6* × *och1*	Low burst	95	*wt*	3—6—1
30. *am3 och6* × *och5*	Low burst	98	*wt*	3—6—5
31. *am33 ts116* × *och6*	3.9 ± 0.4	21	*ts*	6—116—33
32. *am33 ts4* × *och6*	3.0 ± 1.2	97	*wt*	6—33—4
33. *am88 ts79* × *am10*	14.0 ± 0.5	99	*wt*	79—88—10
34. *am3 ts79* × *am10*	1.4 ± 0.7	90	*wt*	79—3—10
35. *am3 tsγ* × *am10*	1.3 ± 0.2	99	*wt*	γ—3—10
36. *am3 ts9* × *am10*	1.6 ± 0.1	42	*ts*	3—10—9
37. *am33 ts116* × *am35*	18.4 ± 1.2	55		116—(35, 33)
38. *am33 ts116* × *am18*	21.9 ± 6.8	56		116—(18, 33)

* Приводимые значения $\times 10^4$.
[+] Это означает, что при скрещивании было получено всего несколько потомков.
По *Benbow R. M.* et. al. 1971. J. Virol., **7**, 549.

щиванием, проверяется затем в реципрокном скрещивании (рис. 7.4). Результаты этих трехфакторных скрещиваний представлены в табл. 7.4.

Приводимые в табл. 7.3 и 7.4 данные однозначно свидетельствуют о том, что генетическая карта фага φX174 имеет форму кольца. Заметим, например, что ген *H* тесно сцеплен как с геном *G*, так и с геном *A*. Аналогичным образом каждый ген тесно сцеплен с двумя соседними, расположенными по обе стороны от него, и поэтому единственно возможная форма карты – кольцевая. Карта, изображенная на рис. 7.5, отражает тот факт, что геном фага φX174 представляет собой кольцевую молекулу ДНК. На карте видно, что некомплементирующие мутации локализованы в смежных участках генома. Это означает, что *функциональные единицы*, выявляемые с помощью комплементационного теста, совпадают со *структурными единицами* генома. Границы между генами на карте указаны произвольно, поскольку использовавшиеся при построении карты мутации не позволяют точно локализовать эти границы. Исследования различных нарушений процесса размножения у конкретных мутантов в непермиссивных условиях позволяют приписать каждому цистрону определенную функцию, как это указано на рис. 7.5.

Геном фага φX174 представляет собой одноцепочечную кольцевую молекулу ДНК, содержащую 5386 нуклеотидов. Эта нуклеотидная последовательность была успешно расшифрована в 1977 г. Фредериком Сэнгером и его коллегами. Соотношение между генетической картой, изображенной на рис. 7.5, и химической картой будет обсуждаться в гл. 12.

Умеренный бактериофаг λ

Исследования умеренного бактериофага λ внесли важный вклад в генетику. Фаг λ содержит линейную молекулу ДНК длиной примерно 49 000 н. п., то есть почти в 10 раз более длинную, чем геном фага φX174. Фаг λ представляет большой интерес, поскольку его генетические регуляторные механизмы довольно сложны. Когда чувствительную бактериальную клетку заражают умеренным бактериофагом, например фагом λ (рис. 7.6), возможны два варианта дальнейших событий. В первом случае фаг реплицируется, производит множество потомков и разрушает клетку. Во втором случае фаговая инфекция приводит к лизогенизации клетки, при этом фаг встраивается в бактериальную хромосому и превращается в пассивный участок бактериального генома. В таком состоянии фаг представляет собой профаг или провирус, реплицирующийся лишь как часть генома хозяина и в таком виде попадающий в дочерние клетки. При этом многие гены фага, потенциально летальные для клетки-хозяина, находятся в неактивном состоянии, или *репрессированы*. Однако иногда фаг может *индуцироваться*, переводя клетку на путь лизиса; клетка погибает, высвобождая многочисленное потомство фага (рис. 7.6). Таким образом, фаг λ служит моделью генетической системы вирус – хозяин. Изучение его функционирования послужило основой для современных представлений об опухолеродных вирусах млекопитающих, способных встраиваться в геном, таких как вирус полиомы и SV40. В этой главе мы рассмотрим различные типы

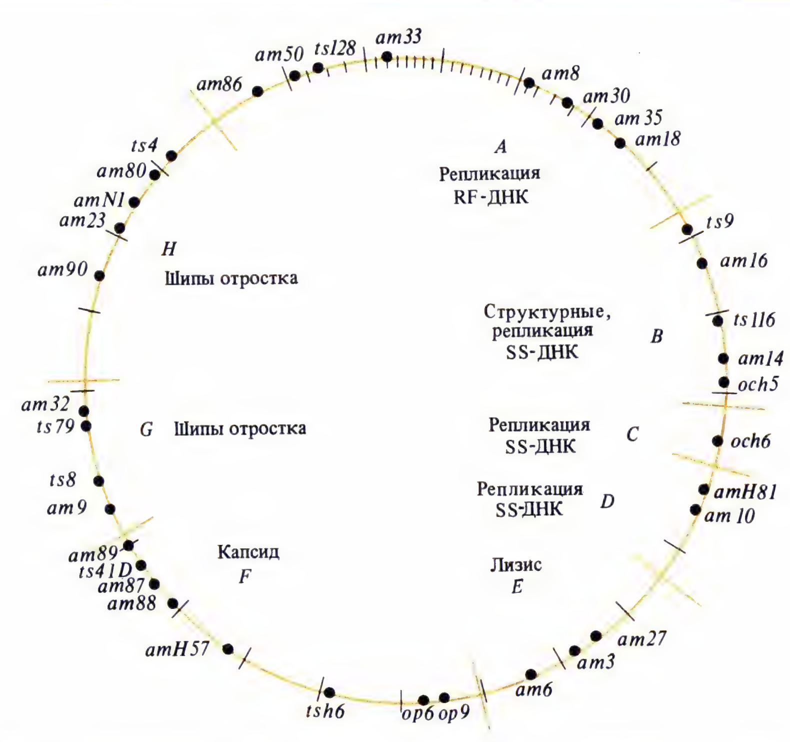


Рис. 7.5. Генетическая карта фага фХ174. Схематически изображены частоты появления рекомбинантов дикого типа при двухфакторных скрещиваниях. Расстояния между черточками соответствуют частоте появления рекомбинантов дикого типа, равной 10^{-4}. Внутри цистрона *A* черточки вне круга соответствуют частотам рекомбинации сайтов внутри цистрона *A* с маркерами в других цистронах; черточки, ориентированные внутрь круга, соответствуют частотам рекомбинаций внутри цистрона *A*. Границы между цистронами (цветные черточки) проведены условно. Указаны функции каждого цистрона. [*Benbow R.M.* et al. (1974). J. Virol., **13**, 898.]

мутаций, обнаруженные у фага λ, а также генетическую и физическую карты его генома. Экспрессия и регуляция генома фага λ будут подробно рассмотрены в гл. 15.

Гены фага λ

Для идентификации мутантов фага λ, так же как и других бактериофагов, анализируют негативные колонии (бляшки). Гены фага λ можно разбить на две группы: существенные для формирования негативных колоний (обозначаются прописными буквами) и несущественные (обозначаются строчными буквами или буквами греческого алфавита). Существенные гены идентифицируются с помощью условно летальных мутаций: либо *sus*, либо *ts*, как уже обсуждалось выше. Комплемента-

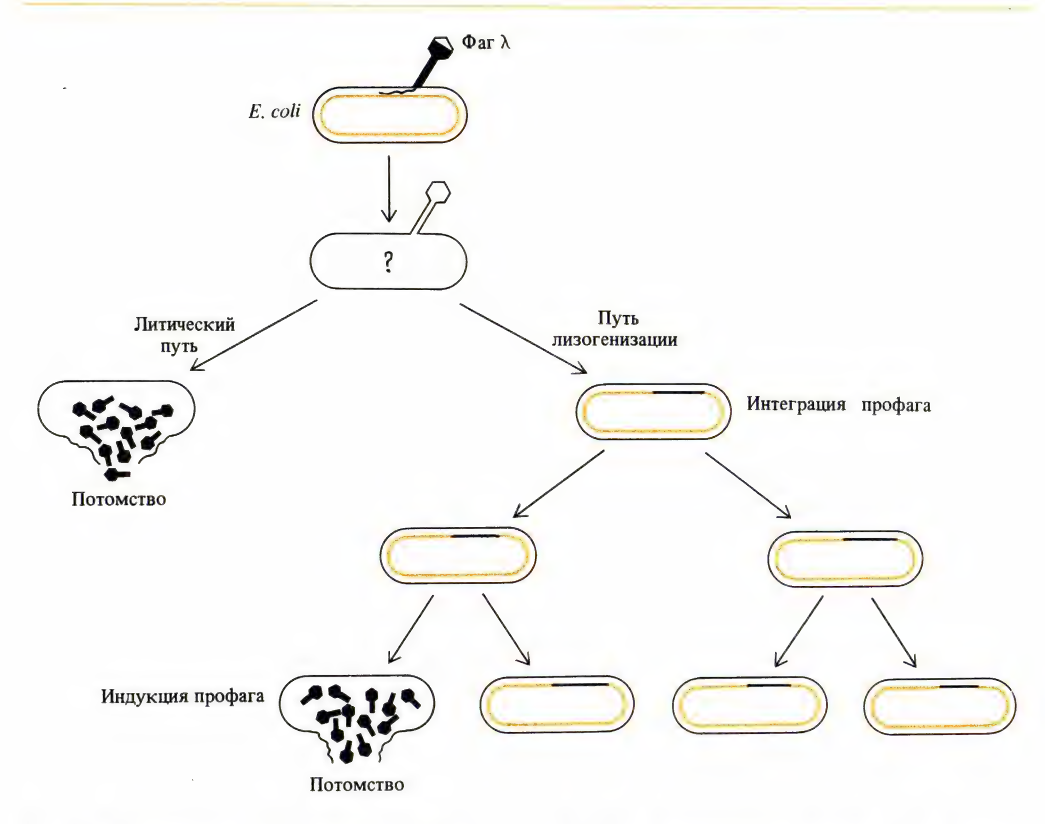


Рис. 7.6. Возможные пути развития бактериальной клетки, зараженной фагом λ: лизис или лизогенизация. Лизис ведет к появлению фагового потомства и гибели клетки. При лизогенизации клетки в ее хромосому встраивается профаг. Изредка индукция профага переводит клетку на путь лизиса.

ционный анализ этих мутаций показал, что они локализованы в 25 различных цистронах. Семь цистронов отвечают за формирование нормальной головки фага, семь других – за формирование нормального хвостового отростка. Эти гены либо кодируют структурные белки, входящие в состав фага, либо необходимы для правильной сборки фаговых частиц. Два гена обеспечивают лизис клетки и высвобождение потомства фага. Еще два гена необходимы для репликации ДНК фага λ, остальные три гена играют важную регуляторную роль.

Несущественные гены идентифицируются по морфологии негативных колоний или при делециях участков генома, в которых они локализованы. Фаги λ дикого типа при посеве на восприимчивого хозяина образуют мутные негативные колонии, поскольку некоторые из инфицированных клеток становятся лизогенными. Клетки, содержащие профаг λ, иммунны по отношению к заражению фагом λ и поэтому размножаются внутри негативной колонии, делая ее мутной. Некоторые мутации (*clear*, *c*) придают фагу способность формировать прозрачные бляшки. Эти мутанты не способны к лизогенизации, и инфицированная ими клетка всегда разрушается. Мутации *clear* обнаружены в четырех раз-

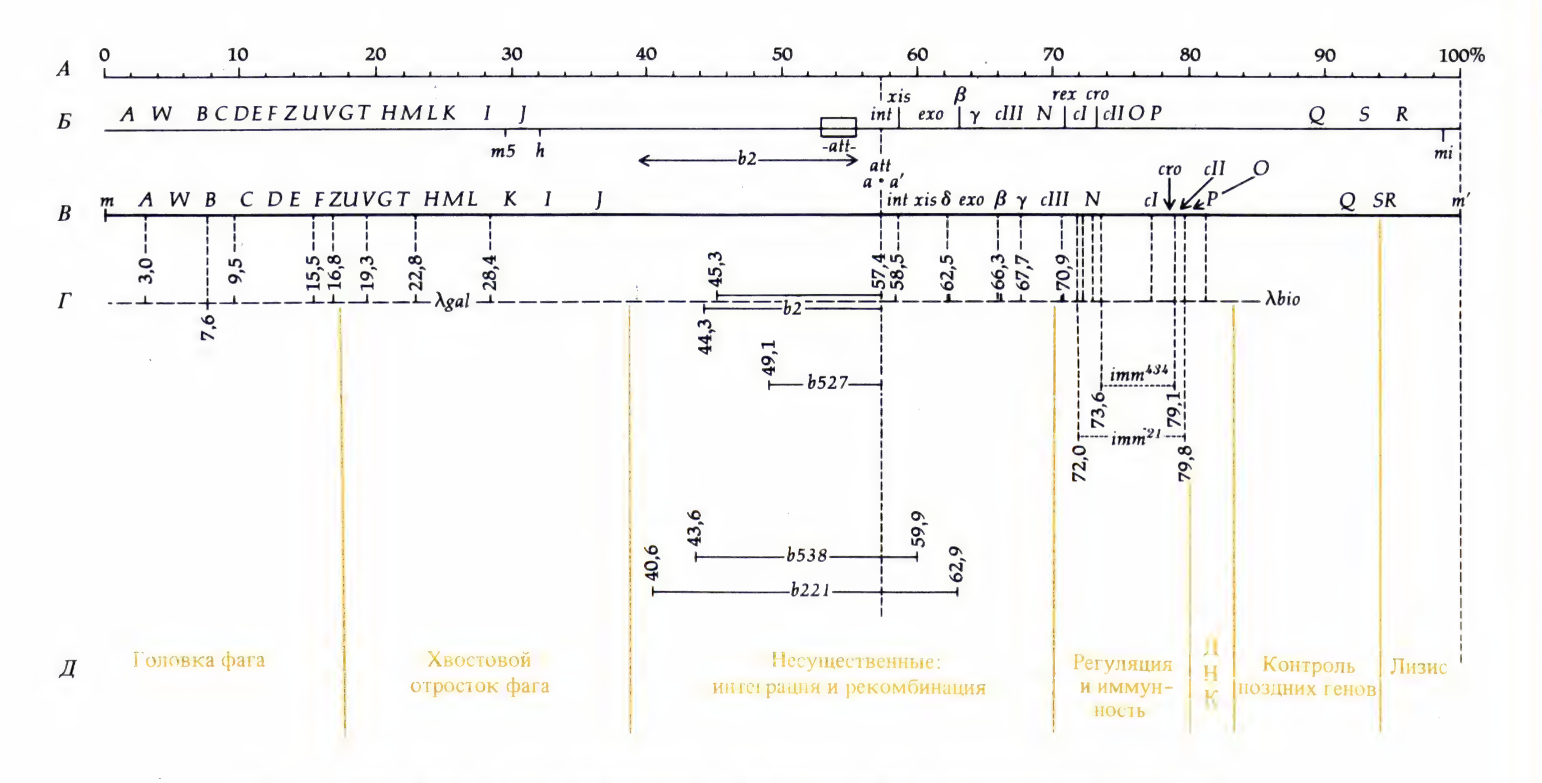


Рис. 7.7. Геном фага λ. Гены, существенные для развития фага, обозначены строчными буквами. *А*. Процентная шкала расстояний вдоль молекулы ДНК. *Б*. Генетическая карта, построенная на основании частот рекомбинации. *В*. Физическая карта, основанная на гетеродуплексном анализе. *Г*. Некоторые из перестроек, использованные при гетеродуплексном картировании: *gal* и *bio* – замещения, *b* – делеции и замены, влияющие на иммунные свойства фагов лямбдоидного семейства. *Д*. Распределение генетических функций в геноме.

личных генах: *cI*, *cII*, *cIII* и *cy*. Другие несущественные гены идентифицируются по мутантным фагам, которые имеют крупную делецию, но тем не менее способны формировать негативные колонии. Делеции в фаге λ обнаружить легко, поскольку несущие делеции фаги содержат в головке меньше ДНК по сравнению с нормальными, а следовательно, их ДНК характеризуются иной плотностью, что выявляется при центрифугировании в градиенте хлористого цезия. Такие мутации с измененной плотностью ДНК обозначаются буквой *b*. Фаговая частица может утратить до 22% ДНК из середины молекулы, не утрачивая способности формировать негативные колонии. Однако фаги с такими делециями не способны к лизогении или генетической рекомбинации, поскольку у них все же нарушены некоторые функции.

На рис. 7.7 изображена генетическая карта, построенная по данным о частоте рекомбинаций между мутациями, затрагивающими размножение фагов. Замечательная особенность этой карты в том, что гены, ответственные за осуществление родственных физиологических функций, сгруппированы вместе (гены формирования головки, формирования хвостового отростка, гены, ответственные за лизис). Другая важная особенность генетической карты фага λ – это ее линейность: выделенная из фаговых частиц λ ДНК имеет форму линейных двухцепочечных молекул.

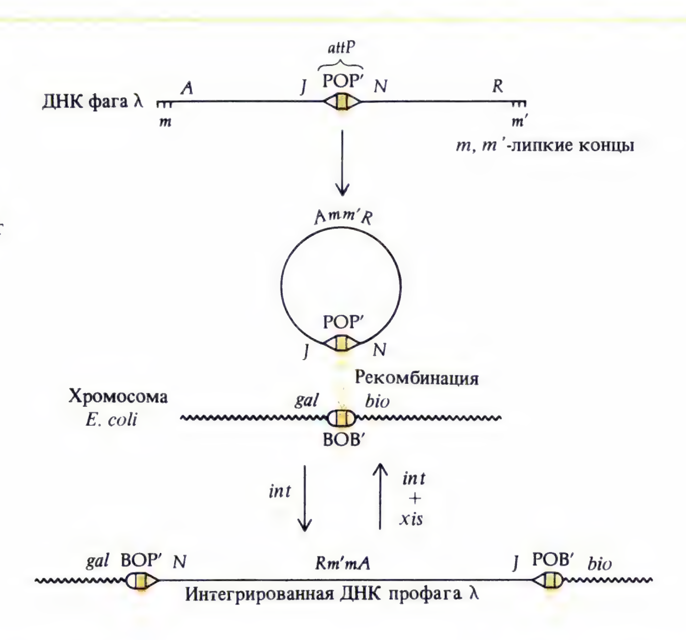
Профаг λ

Мутантные гены, содержащиеся в профаге λ и встроенные в бактериальный геном, можно картировать, используя описанные в следующих главах методы генетики бактерий. Такие исследования показали, что профаг λ встраивается в геном *E. coli* между генами *gal* и *bio*, контролирующими потребление сахара галактозы и синтез витамина биотина соответственно. Последовательность генов на генетической карте профага сравнивали с соответствующей последовательностью на генетической карте фага (рис. 7.8). Они, как ни странно, не тождественны: любая из них получается из другой посредством циклической перестановки. Это различие в последовательности генов возникает из-за механизма, с помощью которого λ-ДНК встраивается в бактериальную хромосому.

Линейная молекула ДНК фага λ имеет комплементарные одноцепочечные концы, состоящие из 12 нуклеотидов. После проникновения в клетку бактерии-хозяина эти «липкие» концы сшиваются ДНК-лигазой и образуется кольцевая молекула. Кольцевая молекула ДНК фага λ может затем встроиться в бактериальную хромосому при участии фагового гена *int*, кодирующего белок, который катализирует сайт-специфическую рекомбинацию между участком прикрепления ДНК фага к хромосоме бактерии (*attP*) и соответствующим бактериальным сайтом (*attB* или *att*λ). При этом хромосома λ разрывается в *attP*-сайте, который локализован в середине генетической карты фага, и в результате происходит изменение последовательности генов в профаге, как это показано на рис. 7.8.

После внедрения в бактериальную хромосому все гены λ, кроме двух, перестают работать (инактивируются) и оказываются под контро-

Рис. 7.8. Карты вирулентного фага и профага λ: показаны механизм интеграции кольцевого генома λ в хромосому хозяина. Сайт *attP* обозначен символом POP′, а сайт *attB* – символом BOB′.



лем репрессора – белка, кодируемого геном *cI*. Наличие репрессора создает у *E. coli* (λ) иммунитет к инфицированию другими фагами λ. Профаг λ реплицируется как часть родительской хромосомы и наследуется дочерними клетками. В популяции лизогенных бактерий примерно 1 из 10^6 клеток в каждом поколении вследствие спонтанной *индукции* профага лизируется и освобождает многочисленное потомство фагов λ (рис. 7.6). Такая способность бактериальной культуры с профагом спонтанно продуцировать фаг объясняет происхождение термина *лизогения*. Причины спонтанной индукции не ясны, однако известно, что нарушение способности клетки-хозяина реплицировать собственную ДНК может вызвать индукцию. Так, например, ультрафиолетовое облучение индуцирует большинство содержащих профаг клеток культуры. Описаны температурочувствительные мутации *cI*-гена, вызывающие индукцию при повышенной температуре. Эти мутации дают удобный экспериментальный метод изучения последовательных этапов индукции. Первое событие, связанное с индукцией,– выход профага из хромосомы. Механизм этого процесса аналогичен механизму включения профага. Выход из хромосомы контролируется двумя генами фага λ, *int* и *xis*; результатом является образование кольцевого генома λ, который начинает реплицироваться посредством θ-механизма и продуцирует множество дочерних геномов. Впоследствии механизм репликации ДНК меняется на σ-тип. Образующиеся при этом линейные геномы фага инкапсулируются в белковую головку (см. гл. 4).

Профаг λ почти всегда вырезается из хромосомы бактерии точно по своим границам, образуя кольцевую форму интактного генома λ. Иногда, однако, вырезание происходит неточно, что приводит к образованию кольцевой молекулы ДНК, в которой один из концевых участков генома профага утрачен, а вместо него включен участок хромосомы *E. coli*, смежный с другим концом генома профага (рис. 7.9). Такие гибридные молекулы могут продуцировать новые жизнеспособные фа-

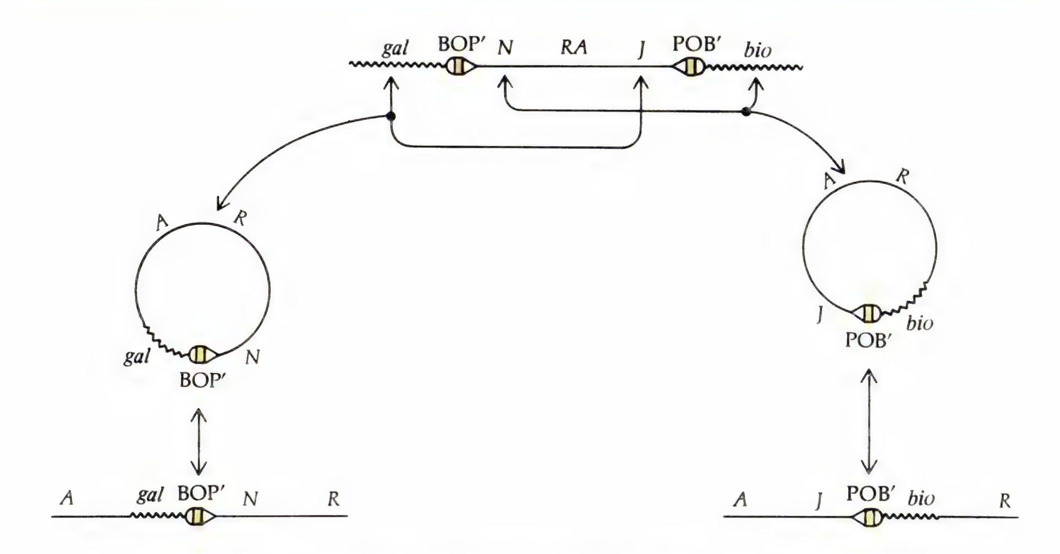


Рис. 7.9. Образование трансдуцирующих фагов λ*gal* и λ*bio* в результате неточного вырезания профага из хромосомы бактериальной клетки.

говые частицы лишь в том случае, если не утрачены какие-либо существенные гены генома λ. Те молекулы, в которые попадает ген *bio E. coli* (λ *bio*), жизнеспособны, так как в них обычно отсутствуют лишь несущественные гены между *attP* и геном *N*. Напротив, молекулы, в которые попадает ген *gal E. coli* обычно неполноценны в результате утраты существенных генов, локализованных между *attP* и левым концом хромосомы. Если какие-либо существенные гены утрачены и фаг не способен формировать негативные колонии, его называют дефектным и в название такого фага вносится буква *d*: λ*dgal*. Фаги λ*dgal* или λ*dbio* (в случае, если утрачен существенный ген *N*) способны размножаться в присутствии нормального фага λ, компенсирующего функции, нарушенные у этих фагов. Фаги λ*dgal* и λ*dbio* легко выявить благодаря их способности трансдуцировать гены gal^+ и bio^+ в gal^-- или bio^--бактерии. Эти трансдуцирующие фаги также могут лизогенизировать клетки *E. coli* (λ*dgal*).

Размер замещенного участка в геноме λ конкретных фаговых штаммов λ*dgal* или λ*bio* можно оценить с помощью комплементационного и рекомбинационного тестов. Например, фаг λ*dgal* можно испытывать на способность либо образовывать рекомбинанты дикого типа в скрещиваниях со множеством различных мутантных линий фага, либо комплементировать с известными мутантами при смешанном инфицировании. В табл. 7.5 представлены данные о наличии или отсутствии рекомбинантов дикого типа при скрещивании нескольких фагов λ*dgal* с носителями определенных *sus*-мутаций в различных цистронах. Если в данном штамме λ*dgal* отсутствует соответствующий ген дикого типа, то рекомбинанты дикого типа не образуются. Эти данные позволяют определить положение левого конца, встроенного в геном λ участка гена *gal* относительно мутаций *sus* на генетической карте, как это изображено на

Таблица 7.5. Рекомбинация между λ *dgal* и *sus*-мутациями в цистронах левого плеча фага λ

	λ *dgal1*	λ *dgal2*	λ *dgal3*	λ *dgal4*	λ *dgal5*
λ *susA*	–	+	+	+	+
λ *susB*	–	–	+	+	+
λ *susE*	–	–	–	+	+
λ *susG*	–	–	–	–	+
λ *susH*	–	–	–	–	+
λ *susM*	–	–	–	–	–

«+» наличие рекомбинантов дикого типа; «–» их отсутствие.
По *Campbell A.* 1959. Virology, **9**, 293.

рис. 7.10. Правый конец этого участка всегда совпадает с сайтом интеграции *attP*.

После того как получен набор λ*dgal* фагов с картированными левыми концами, уже легко оказывается определить положение неизвестных точечных мутаций относительно этих концов: требуется лишь узнать, образуются ли рекомбинанты дикого типа между неизвестным мутантом и фагом соответствующей линии λ*dgal*. Эта методика аналогична методике картирования *rII*-мутаций с помощью делеций (см. гл. 6).

Сопоставление генетической и физической карт фага λ

Данные электронной микроскопии позволяют установить точное соответствие между генетической картой фага λ, построенной на основе данных о рекомбинации, и молекулой ДНК, представляющей собой хромосому фага λ. Для решения этой задачи используют делеции (λ*b*)

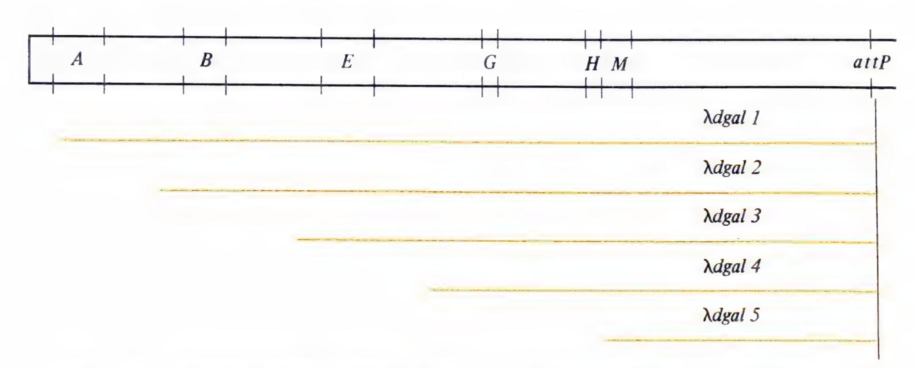


Рис. 7.10. Локализация конечных точек *gal*-замещений на генетической карте фага λ производится по наличию рекомбинантов дикого типа в скрещиваниях между штаммами λ*dgal* с известными *sus*-мутантами. Изображенная карта построена по данным таблицы 7.5.

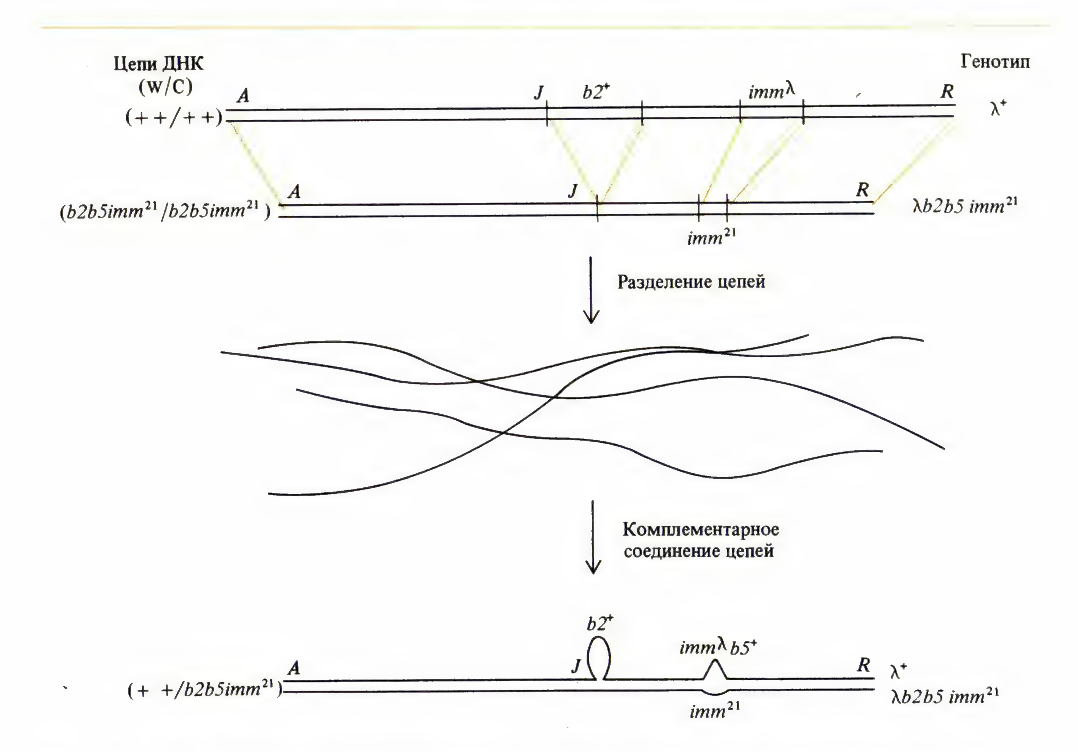
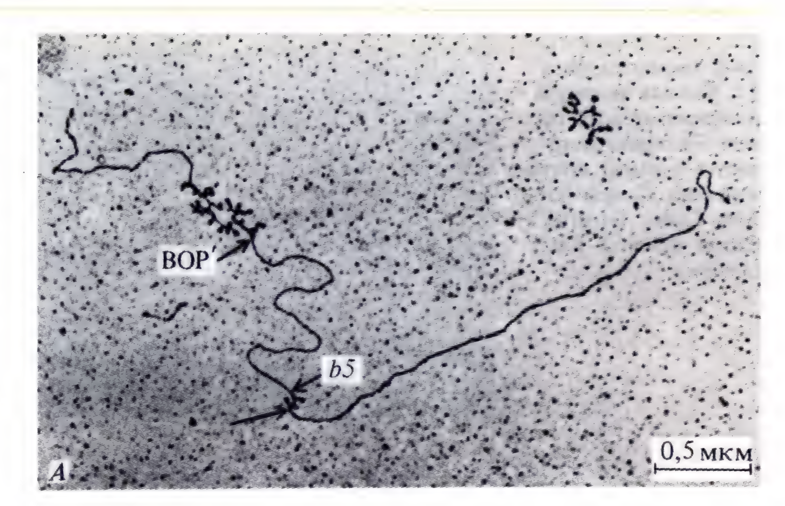


Рис. 7.11. Схема образования гетеродуплекса между одноцепочечными молекулами ДНК, исходно входившими в состав двухцепочечных молекул, различающихся между собой делециями и перестройками. Геном, в котором участок imm^{21} заменен на imm^{λ}, короче генома фага λ дикого типа; такая перестройка называется делецией *b*5.

и замещения (λ*dgal*, λ*bio*), описанные в предыдущем разделе. Кроме того, оказываются полезными близкородственные «лямбдоидные» фаги (фаги 434, 82, 21), геном которых содержит некоторые гены, общие с фагом λ, а также негомологичные фагу λ области. Каждый член семейства лямбдоидных фагов синтезирует характерный лишь для него уникальный репрессор, и, следовательно, ответственные за иммунитет участки генома (*imm*) у них также уникальны. Другими словами, области иммунитета в разных лямбдоидных фагах негомологичны. На рис. 7.11 схематически представлено образование гетеродуплексных молекул ДНК, в которых каждая комплементарная цепь имеет свое генетическое происхождение. Электронно-микроскопическое исследование таких гетеродуплексных молекул позволяет идентифицировать комплементарные и некомплементарные области (рис. 7.12). Более точно можно сказать, что хорошо воспроизводимые измерения протяженности двухцепочечных участков таких гетеродуплексных молекул ДНК позволяют установить положение концевых точек делеций и добавок в таких молекулах. Соответствие между этими концевыми точками в молекуле ДНК и концами соответствующих перестроек на генетической карте можно установить, получая гетеродуплексы из одноцепочечных молекул



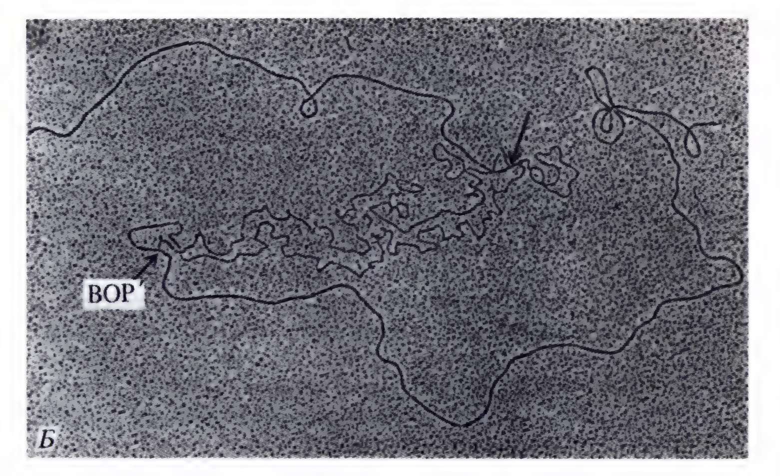


Рис. 7.12. Электронная микрофотография гетеродуплекса λ*gal*/λ. *А*. Препарат гетеродуплекса λ*dgal* P73/λ*b*5. Одноцепочечные участки на фотографии испещрены кружочками (обозначение *b*5 объяснено в подписи к предыдущему рисунку). *Б*. Препарат гетеродуплекса λ*dgal* *P74*/λ$^+$, на котором отчетливо видны одноцепочечные участки. Измерение длины двухцепочечных участков дает оценку физического расстояния от концов делеций до концов молекулы. Присутствие делеции *b*5 на микрофотографии *А* показывает, что правый конец изображенной здесь молекулы соответствует правому концу генетической карты, поскольку *b*5 расположена справа от *gal*. [*Davis R. W., Parkinson J. S.* (1971). J. Mol. Biol., **56**, 403.]

ДНК с известными генетически картированными делециями и добавками (рис. 7.11). Такой гетеродуплексный анализ позволяет построить физическую карту параллельно с генетической картой на рис. 7.7. Поскольку известна общая длина молекулы ДНК λ (она составляет около 49 000 н. п.), можно определить примерную величину каждого гена.

Организация генома фагов Т2 и Т4

Крупные фаги Т2 и Т4 близкородственны. Они обладают идентичной организацией генома, и большинство генов у них общие. Радиоавтография хромосомы фага Т4 (рис. 7.13) свидетельствует о линейности молекулы ДНК. Ее мол. масса равна $120 \cdot 10^6$ дальтон, а длина составляет 182 000 пары нуклеотидов. Фаг Т4 был предметом интенсивных генети-

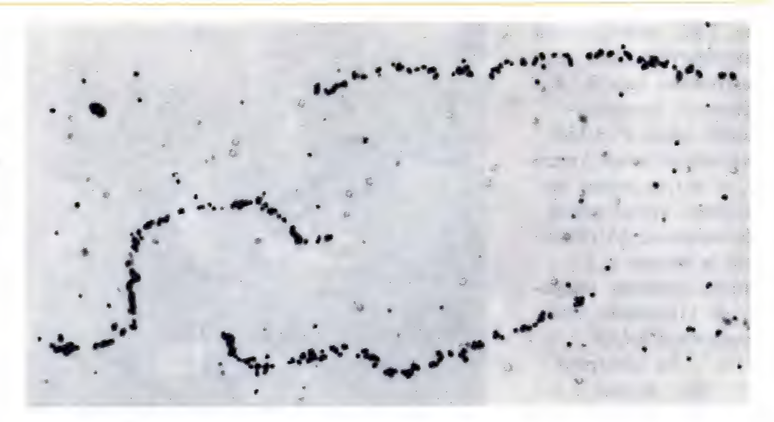


Рис. 7.13. Радиоавтограф хромосом фага T2. Каждая молекула содержит полный геном бактериального вируса и имеет протяженность 52 мкм (Dr. *John Cairns*, Imperial Cancer Research Fund, London.)

ческих исследований (вспомните *rII*-мутанты из гл. 6), и для него известны мутации во многих цистронах. Анализ рекомбинации с использованием трех- и четырехфакторных скрещиваний показал, что генетическая карта фага T4 имеет кольцевую форму (рис. 7.14). Противоречие между линейностью молекулы ДНК фага и кольцевой формой его генетической карты удалось разрешить в результате генетических и физических экспериментов, показавших, что выделенные из фага T2 линейные молекулы ДНК содержат на обоих концах участки с одинаковыми последовательностями нуклеотидов (*концевую избыточность*), а порядок генов в молекуле допускает *циклические перестановки*. Физические данные о концевой избыточности (дуплицированности) последовательностей оснований получены из экспериментов, в которых ДНК T2 подвергалась действию экзонуклеазы III. Этот фермент последовательно отщепляет нуклеотиды с 3-OH-концов цепей ДНК, в результате чего на концах двухцепочечной молекулы образуются одноцепочечные участки с 5′-PO_4-концами (рис. 7.15). Инкубация этих подвергнутых действию фермента молекул в условиях, допускающих установление водородных связей между комплементарными одноцепочечными последовательно-

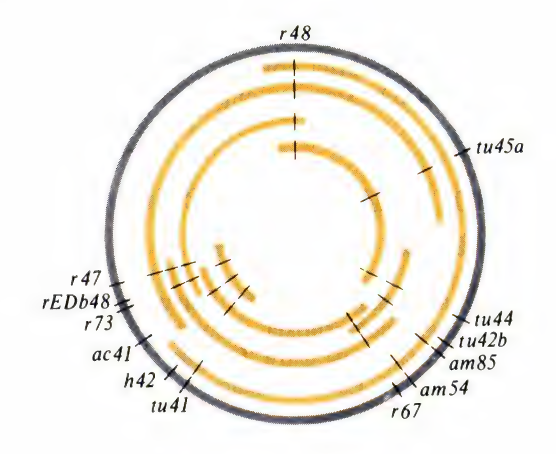


Рис. 7.14. Кольцевая генетическая карта фага T4. На цветных дугах обозначены маркеры, сцепление между которыми определяли в трех- и четырехфакторных скрещиваниях.

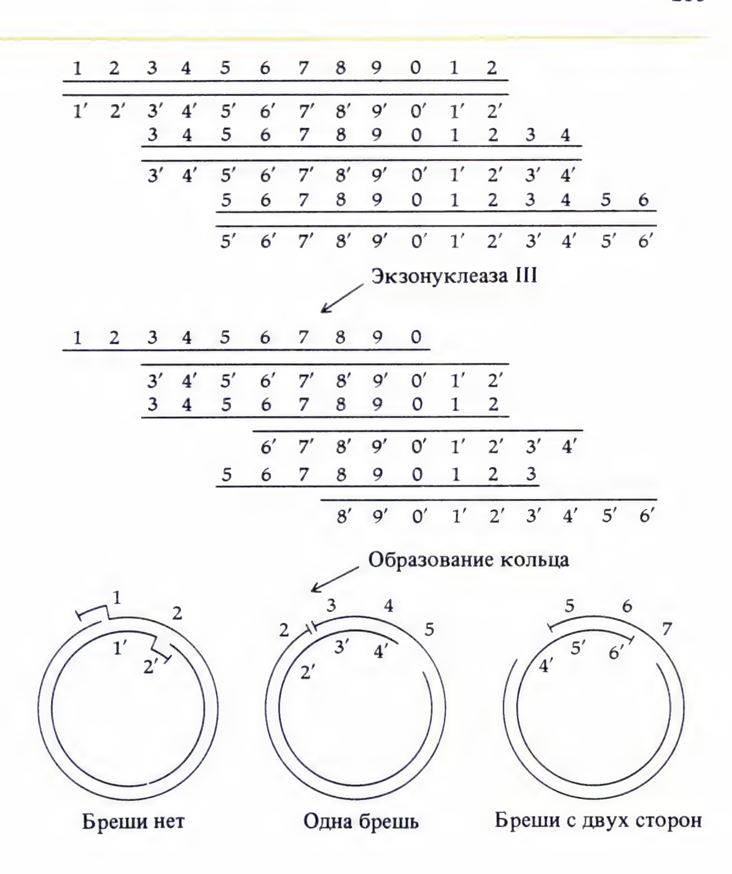
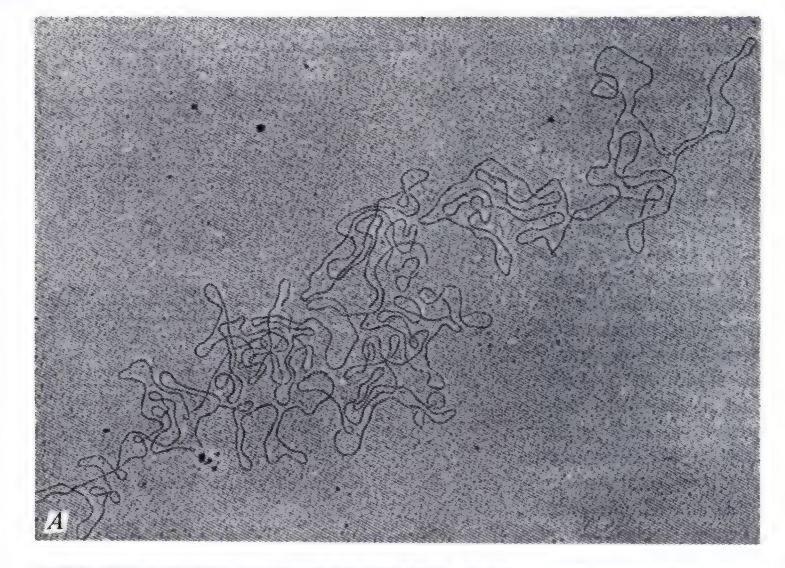


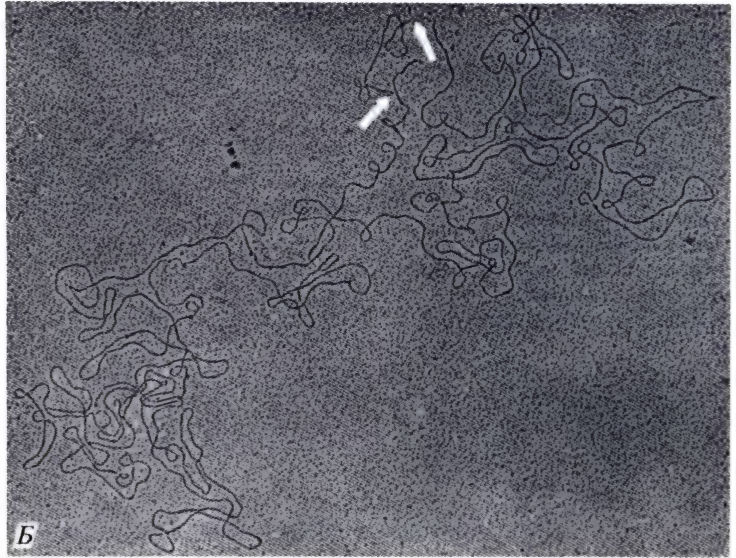
Рис. 7.15. Схема, демонстрирующая концевую избыточность в геноме фага Т2 и образование кольцевой молекулы ДНК. Каждую из трех молекул можно превратить в любую другую путем циклической перестановки, и оба конца каждой молекулы содержат концевые повторы. Экзонуклеаза III действует на 5′-концы (место действия фермента указано стрелкой), и образовавшиеся комплементарные участки «склеиваются», образуя кольцевые молекулы. Если длина отрезанных концов превышает длину повторяющихся участков, то в кольцевой молекуле дуплексный сегмент оказывается обрамленным двумя одноцепочечными участками (брешами). Длина двухцепочечного сегмента (и его состав) совпадает с длиной концевых повторов (см. рис. 7.16).

стями, приводит к образованию кольцевых молекул (рис. 7.16). Замыкание в кольцо возможно лишь в том случае, если двухцепочечная молекула ДНК фага Т2 содержит идентичные последовательности оснований на обоих концах, как это схематически изображено на рис. 7.15. Прежде чем молекулы становятся способны образовывать кольца, фермент должен отщепить около 2% ДНК Т2. Это означает, что протяженность дуплицированных (избыточных) концов молекулы составляет около 1% длины генома.

Генетические данные о концевой избыточности геномов фагов Т2 и Т4 проистекают из существования гетерозиготных фаговых частиц. Фаговые гетерозиготы возникают в результате рекомбинации между фагами с различными генотипами. Они легко идентифицируются, поскольку каждый такой фаг образует негативную колонию, содержащую фаги обоих генотипов (см. рис. 6.1). Геном единичного фага может быть

Рис. 7.16. Электронная микрофотография кольцевых молекул ДНК фага Т2. *А*. Кольцевая молекула протяженностью 54,9. *Б*. Кольцевая молекула, на которой видны два близко расположенных одноцепочечных участка, разделенные дуплексным сегментом длиной 1,7 мкм (см. стрелки). Этот дуплексный сегмент соответствует концевой избыточности молекулы. [*Mac Hattie L. A.* et al. (1967). J. Mol. Biol., **23,** 355.]





гетерозиготным лишь по тесно сцепленным генам. В популяции фагов, однако, встречаются гетерозиготы по всем генам, безотносительно к их положению на карте. Кроме того, размер участка, по которому фаг избыточен и гетерозиготен, увеличивается у мутантов, несущих делеции, в связи с особым механизмом упаковки, который мы вкратце рассмотрим ниже. (В отличие от фага λ у фагов Т2 и Т4 делеции не уменьшают количество ДНК в головке фага.) Из этих наблюдений можно сделать лишь один логический вывод: не существует единственного уникального порядка генов вдоль всей молекулы ДНК, другими словами, у конкретных фагов в популяции избыточным может быть любой ген.

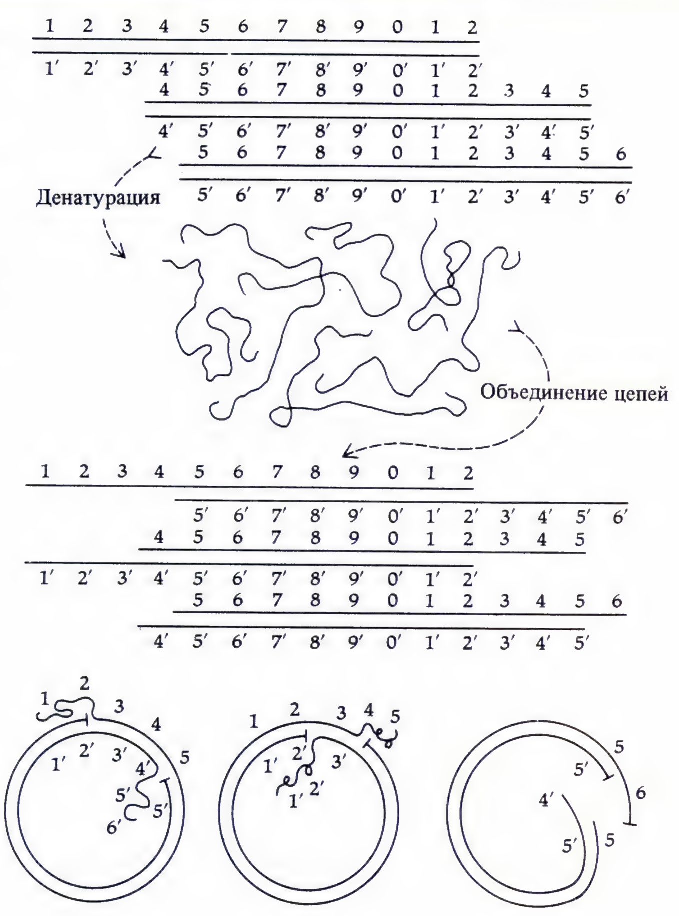
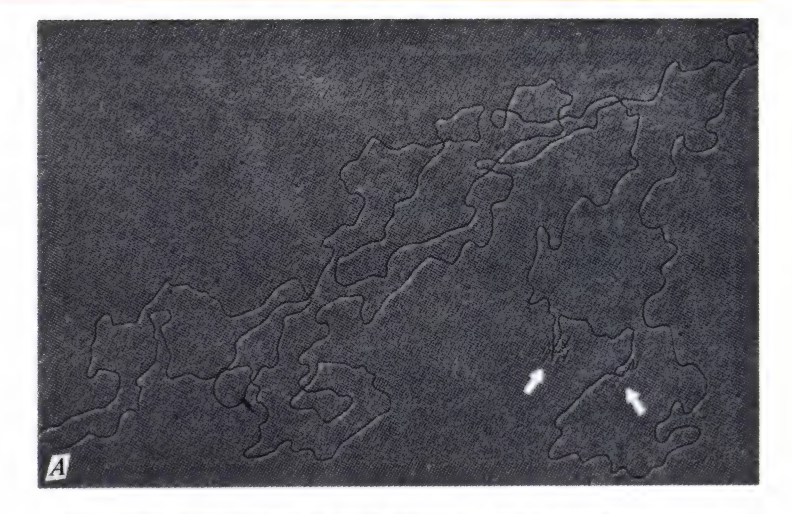


Рис. 7.17. Схема, демонстрирующая циклические перестановки (пермутации) нуклеотидных последовательностей геномов в популяции фагов Т2. Каждая пермутация имеет концевой повтор. Концевые повторы не находят себе комплементарных партнеров и оказываются вне кольцевого дуплекса.

Следующий эксперимент подтверждает это поразительное заключение. Препарат ДНК фага Т2 денатурировали нагреванием, для того чтобы разделить комплементарные цепи каждой молекулы. Смесь одиночных цепей выдерживали затем в условиях, допускающих восстановление водородных связей между комплементарными последовательностями оснований. Большинство одиночных цепей в смеси оказалось способно восстановить двухцепочечную структуру с партнером, исходно принадлежавшим другой нативной молекуле ДНК (рис. 7.17). При электронно-микроскопическом анализе такой смеси обнаруживается много кольцевых двухцепочечных молекул (рис. 7.18). Образование двухцепочечных структур возможно лишь в том случае, если исходный препарат ДНК содержит такую популяцию молекул, в которой последовательность генов в любой молекуле можно получить посредством циклической перестановки (пермутации) генов в любой другой молекуле. Именно циклические перестановки и концевая избыточность индивидуальных молекул ДНК фагов Т2 и Т4 обусловливают кольцевую структуру их генетической карты, отражая отношения сцепления между генами в популяции индивидуальных молекул.



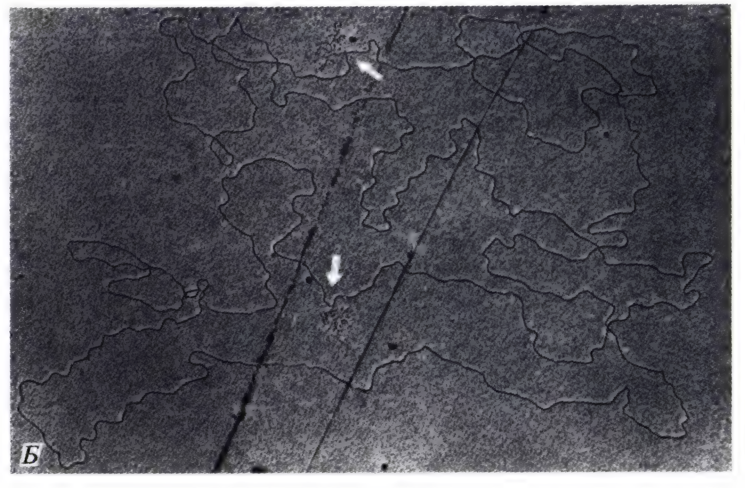


Рис. 7.18. Электронная микрофотография кольцевого дуплекса фага Т2, образовавшегося так, как это схематически изображено на рис. 7.17. Стрелками показаны одноцепочечные «петли», образованные концевыми повторами. [*Mac Hattie L. A.* et al. (1967). J. Mol. Biol., **23**, 355.]

Специальный способ репликации ДНК и упаковки дочерних молекул ДНК в головки фагов Т2 и Т4 обеспечивает возможность получения от единичных фаговых частиц потомства с циклической перестановкой и концевой избыточностью. На ранних стадиях инфекции линейная родительская молекула ДНК претерпевает несколько последовательных репликаций, образуя такие же линейные дочерние молекулы, содержащие весь геном фага плюс концевую избыточность. Затем в результате рекомбинации между избыточными концами дочерних молекул образуются конкатемеры (тандемно повторяющиеся последовательности геномов фага (рис. 7.19), которые затем реплицируются и рекомбинируют, образуя еще более длинные конкатемеры. На заключительной стадии инфекции молекулы ДНК начинают упаковываться в головки (капсиды) фагов (вспомните рис. 7.2). Размер молекулы ДНК, помещае-

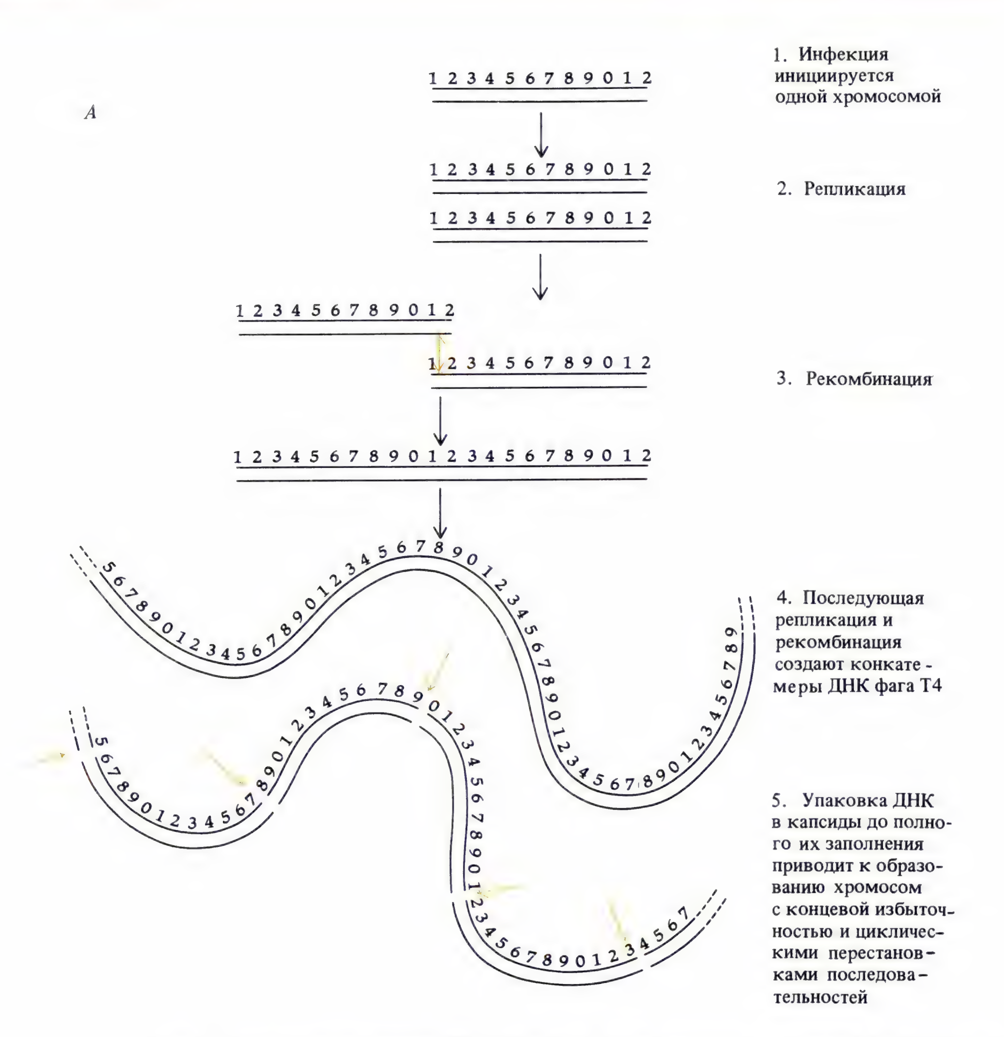


Рис. 7.19. *А*. Конкатемеры ДНК фага Т4. При упаковке в головки фага из них формируются молекулы ДНК с концевыми повторами и циклическими перестановками.

мой в капсид каждого фага, определяется размером самого капсида. Капсид вмещает чуть больше ДНК, чем ее содержится в геноме фага Т4, как раз настолько, чтобы осталось место для избыточных участков на концах генома. Такой механизм упаковки ДНК посредством отрезания от длинного конкатемера кусков, по длине несколько превышающих протяженность генома фага, приводит к циклической перестановке (пермутации) последовательности генов в отдельных дочерних фагах,

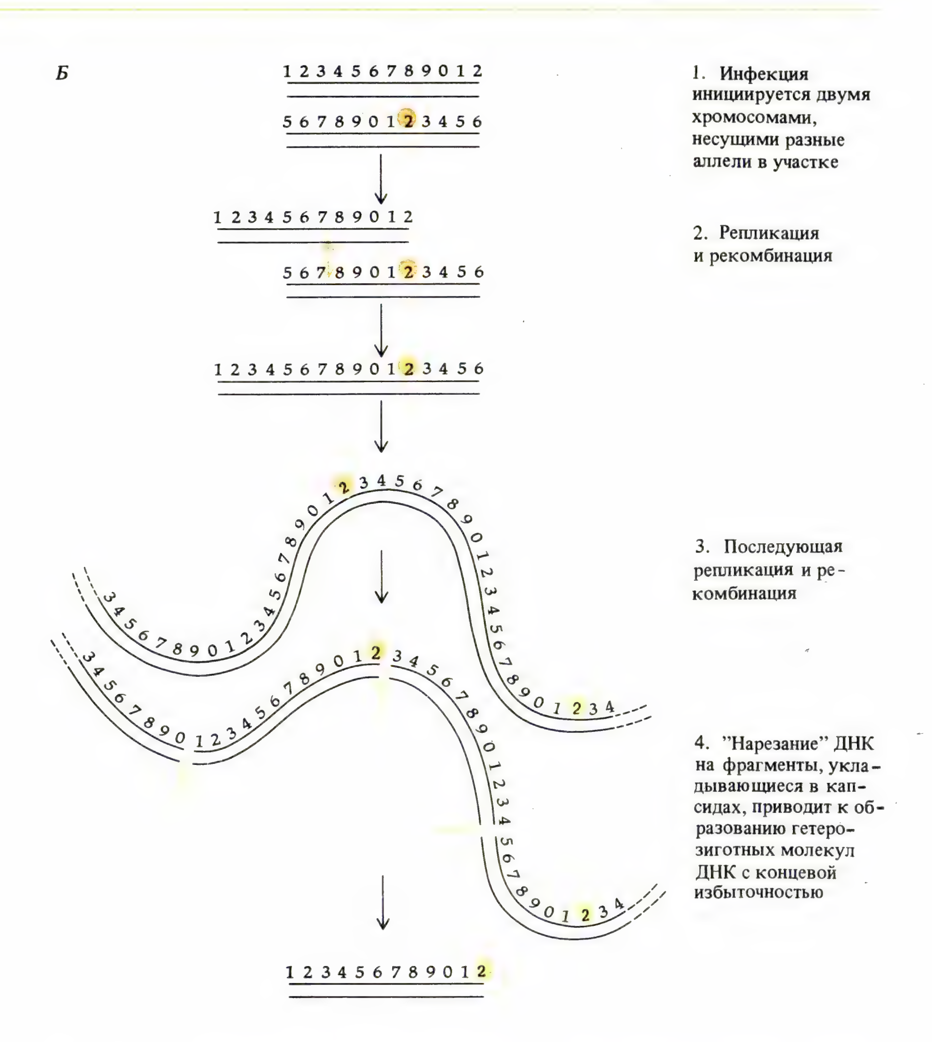


Рис. 7.19. *Б*. Рекомбинация между геномами с различными аллелями, например в участке 2 может привести к возникновению гетерозиготного потомства с концевой избыточностью.

как это схематически показано на рис. 7.19. Тот же самый механизм инкапсулирования геномов фага Т4 приводит к возникновению гетерозигот с избыточными концами в двукратно инфицированных клетках (рис. 7.19). Такой тип организации генома встречается не только у бактериофагов. Он обнаружен также, например, у так называемого «вируса 3 лягушки» – вируса, способного инфицировать клетки многих видов позвоночных, в том числе и человека, при температуре ниже 32°С.

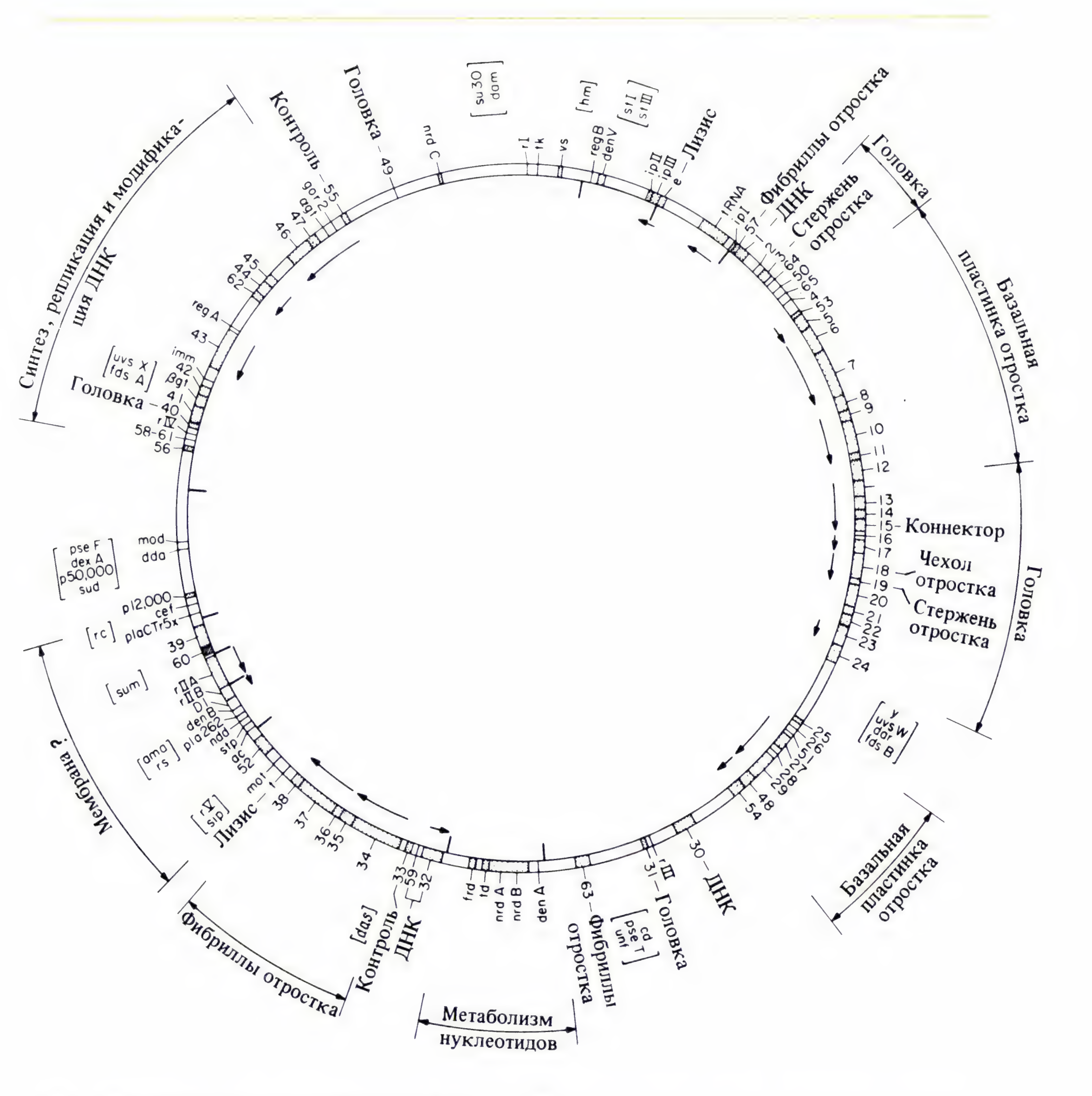


Рис. 7.20. Генетическая карта бактериофага T4, на которой видно, что гены, участвующие в сборке головки, хвостового отростка и гены синтеза ДНК сгруппированы вместе. Стрелки внутри кольца указывают единицы транскрипции. [*Wood W.B., Revel H.R.* (1976). Bact. Rev., **40**, 847.]

На генетической карте фага T4 (рис. 7.20) видно, что вместе сгруппированы гены, ответственные за родственные физиологические функции. Такая же организация генома уже встречалась нам у фага λ. Этот тип организации функционирования генома играет важную роль в ее регуляции (гл. 15).

Литература

Benbow R. M. et al. (1971). Genetic map of bacteriophage фX174, J. Virol., **7**, 549–558.
Benbow R. M. et al. (1974). Genetic recombination in bacteriophage фX174, J. Virol., **13**, 898–907.
Cairns J., Stent G. S., Watson J. D., eds., 1966. Phage and the Origins of Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
Casjens S., King J. (1975). Virus assembly, Annu. Rev. Biochem., **44**, 555–611.
Hershey A. D., ed., 1971. The Bacteriophage Lambda, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
Kaiser A. D. (1957). Mutations in a temperate bacteriophage affecting its ability to lysogenize *Escherichia coli*, Virology, **3**, 42–61.
Stent G. S., 1963. Molecular Biology of Bacterial Viruses, W. H. Freeman, San Francisco.

Ключевые слова и понятия

Белок-репрессор
Генетическая карта
Гетеродуплекс
Двухфакторное скрещивание
Индукция профага
Конкатемер
Концевая избыточность последовательности ДНК
Лизогенизация
Липкие концы
Литический путь
Морфогенез фага T4
Мутации *amber*, *ochre*, *opal*
Мутации *clear* фага λ
Неселективный маркер
Низкая отрицательная интерференция
Одиночный цикл развития фага
Профаг
Селективный маркер
Супрессорчувствительные мутации
Температурочувствительные мутации
Трехфакторное скрещивание
Физическая карта
Циклическая перестановка (пермутация) последовательности ДНК

Задачи

7.1. В таблице представлены результаты комплементационного теста между различными температурочувствительными фаговыми мутантами; «+» означает присутствие негативных колоний при непермиссивной температуре. Распределите мутации по группам комплементации.

	ts1	*ts2*	*ts3*	*ts4*	*ts5*	*ts6*
ts1	–					
ts2	–	–				
ts3	+	+	–			
ts4	+	+	+	–		
ts5	+	+	–	+	–	
ts6	+	+	+	+	–	–

7.2. Определите условия эксперимента при постановке теста на комплементацию между следующими парами условно летальных мутаций фага:
а) *amber*, *amber*;
б) *amber*, *ochre*;
в) теплочувствительная, теплочувствительная;
г) холодочувствительная, холодочувствительная;
д) *amber* и теплочувствительная;
е) теплочувствительная, холодочувствительная.

7.3. Перечислите пермиссивные и непермиссивные условия для каждой из мутаций и селективные маркеры при постановке трехфакторных скрещиваний в следующих комбинациях мутантов:

а) *amber*, *amber*, температурочувствительная;
б) *opal*, температурочувствительная, температурочувствительная;
в) *ochre*, *ochre*, *amber*;
г) морфология негативных колоний, *amber*, температурочувствительная;
д) *ochre*, *opal*, морфология негативных колоний;
е) специфичность к хозяину, специфичность к хозяину, размер негативных колоний.

7.4. Проведены двухфакторные скрещивания между четырьмя температурочувствительными мутантами. Цифры в таблице означают долю рекомбинантов дикого типа в потомстве при культивировании при 40°С. Определите последовательность генов на генетической карте.

	A5	*A7*	*A43*	*A96*
A5	–			
A7	16%	–		
A43	20%	4%	–	
A96	6%	10%	14%	–

7.5. Проведены скрещивания температурочувствительных мутантов мелкого фага с кольцевым геномом. Проанализируйте таблицу и постройте карту хромосомы фага.

Скрещивание	Доля рекомбинантов дикого типа при 40 °С, %
24 × 26	5
24 × 29	7
29 × 210	3
27 × 24	15
26 × 29	12
210 × 27	5
26 × 27	10

7.6. На мутантах мелкого фага были поставлены два указанных ниже трехфакторных скрещивания. Считайте, что селективные маркеры всегда теснее сцеплены по сравнению с неселективными. Постройте карту последовательности мутантных генов.

Скрещивание	Неселективные маркеры	Наиболее распространенный генотип
amAts1 × *amB*	*ts*	Дикий тип
amAts2 × *amB*	*ts*	Температурочувствительный

7.7. Были поставлены следующие трехфакторные скрещивания. Принимая предположение, которое было сделано в условии задачи 7.6, определите последовательность генов на генетической карте.

Скрещивание	Неселективный маркер	Наиболее распространенный генотип
am A × amc ts 4	*ts*	Дикий тип
	am	
ts 2 × *am C ts 4*		Дикий тип
ts 2 × *am B ts 4*	*am*	*amber*
ts 1 × *am B ts 3*	*am*	Дикий тип

7.8. На мутантах мелкого фага были поставлены следующие трехфакторные скрещивания. Принимая предположения, сделанные в условиях двух предыдущих задач, постройте карту последовательности генов.

Скрещивание	Неселективный маркер	Наиболее распространенный генотип
am A ts 1 × × *am B*	*ts*	*ts*
ts 1 am B × × *ts 2*	*am*	*am*
ts 1 am A × × *ts 2*	*am*	*am*
am B ts 2 × × *am A*	*ts*	*ts*

7.9. Для изучения комплементации между различными мутациями у фагов часто определяют разницу в их урожае в пермиссивных и непермиссивных клетках при смешанной инфекции. Проанализируйте таблицу и распределите мутации по комплементационным группам.

	sus 11	*sus 13*	*sus 2*	*sus 4*	*sus 14*
sus 11	0,002	0,44	0,51	0,30	0,010
sus 13		0,003	0,015	0,60	0,40
sus 2			0,005	0,58	0,38
sus 2				0,003	0,42
sus 4					0,006
sus 14					

7.10. ф105 – это умеренный фаг; его хозяином является бактерия *Bacillus subtilis.* Фаговые частицы дикого типа образуют мутные негативные колонии при температуре как 30, так и 40°С. В двухфакторных скрещиваниях было картировано несколько температурочувствительных мутаций. Указанные в таблице цифры соответствуют доле (%) рекомбинантов дикого типа в соответствующих скрещиваниях, проведенных при температуре 40°С. Постройте по этим данным генетическую карту.

	N10	N15	N22	N29	N30	N31	N34
N9	3,9	13,4	5,2	10,4	—	13,2	—
N10		16,9	6,6	12,5	3,9	5,3	1,7
N15			5,1	2,2	12,3	16,1	15,8
N22				2,6	11,2	13,7	10,4
N29						13,8	—
N30						1,5	4,0
N31							4,1

Мутант *cc1* образует при обеих температурах прозрачные негативные колонии, а мутант *c4* дает мутные негативные колонии при 30°С и прозрачные при 40°С. По представленным ниже данным постройте генетическую карту фага ф105, включающую уже построенную ее часть.

Скрещивания	Прозрачные бляшки / Мутные бляшки
+ + × N15, *cc1*	149/1304
+ + × N22, *cc1*	213/1441
+ + × N10, *cc1*	251/1459
+ + × N31, *cc1*	104/1548
cc1 × *c4*	2339/8
c4 × N15	980/123
c4 × N22	846/159
c4 × N9	1010/151
c4 × N31	1248/68

По *Rutberg L* (1969). J. Virol., **3**, 38.

7.11. Проводили приведенные ниже трехфакторные скрещивания и каждый раз отмечали преобладающий генотип по неселективному маркеру. Во всех скрещиваниях селективные маркеры были теснее сцеплены друг с другом, чем каждый из них с неселективным (сцепленность предварительно определяли в двухфакторных скрещиваниях). Определите последовательность мутантных генов на генетической карте.

Скрещивание	Преобладающий генотип
am A ts 1 × *ts 5*	*am*
am A ts 5 × *ts 1*	*wt*
am C ts 3 × *ts 9*	*am*
am C ts 9 × *ts 3*	*wt*
am E ts 9 × *ts 3*	*am*
am E ts 3 × *ts 9*	*wt*
am N ts 1 × *ts 5*	*wt*
am N ts 5 × *ts 1*	*am*
am C ts 1 × *am A*	*ts*
am C × *am A ts 1*	*wt*
am E ts 1 × *am N*	*ts*
am N ts 1 × *am E*	*wt*
am C ts 9 × *am* 1	*wt*
am A ts 9 × *am C*	*ts*

7.12. Клетки *E. coli*, лизогенные по фагу λ, устойчивы к нему и не могут быть инфицированы этим же фагом λ. Однако возможно одновременное инфицирование чувствительных клеток двумя фагами λ с различными генотипами; получаемые при этом клетки называются

двойными лизогенами и содержат в генотипе оба профага. Двойная инфекция фагами λ и λ*cI* приводит к образованию лизогенов, содержащих оба профага, тогда как фаг λ*cI* сам по себе никогда не лизогенизирует клетку даже в присутствии «хелпера» λcI^+ во время инфекции. Опишите схематически возможную последовательность событий, приводящую к такой двойной лизогении. Что вы можете сказать относительно продукта гена cI^+?

7.13. Первые генетические исследования фага λ относились к мутациям, изменяющим размер или морфологию негативных колоний. Вот некоторые из этих мутаций: *s* (*small*, мелкие бляшки), *c* (*clear*, прозрачные бляшки, а не мутные, впоследствии обозначенные символом *cI*), co_1 и co_2 (*cocarde*) прозрачные; в настоящее время для них приняты обозначения *cIII* и *cII* соответственно), *mi* (*minute*, очень мелкие бляшки, меньшие, чем у мутанта *s*). В таблице приведены данные по некоторым трехфакторным скрещиваниям этих мутантов. Постройте генетическую карту с указанием расстояний между соседними генами.

Скрещивание	Потомство								
	+ + / + ;	*s co* / *mi* ;	*s* + / + ;	+ co_1 / *mi* ;	*s* co_1 / + ;	+ + / *mi* ;	*s* + / *mi* ;	+ *co* / +	Итого
s co_1 *mi* × + + +	975	924	30	32	61	51	5	13	2091
s + *mi* × + co_1 +	38	23	273	318	112	121	6389	5050	12 324
	+ + / + ;	+ + / *mi*							
c + + × co_1 *mi*	8	1							6600
co_2 + + × + *c mi*	28	13							5800

По Kaiser A. (1957). Virology, **3**, 42.

7.14. Фаги λ*cII* и λ*cIII* могут лизогенизировать клетки *E. coli* в присутствии фагов хелперов λ^+ или λ*cI*. Зная ответы на две предыдущие задачи, что вы можете сказать относительно *cI*, *cII* и *cIII*?

7.15. Все умеренные фаги лямбдоидного семейства обладают «липкими» концами. Большинство из них способно встраиваться в различные участки хромосомы хозяина и обладают иммунными свойствами, перечисленными ниже в таблице, где «+» означает успешное инфицирование, а «–» устойчивость к инфекции.

Фаг	Штамм *E. coli*				
	K12	K12(λ)	K12 (434)	K12 (82)	K12 (21)
λ	+	–	+	+	+
434	+	+	–	+	+
82	+	+	+	–	+
21	+	+	+	+	–

При смешанной инфекции некоторые лямбдоидные фаги могут обмениваться генами друг с другом. В прилагаемой таблице указывается присутствие рекомбинантов дикого типа с λ-иммунностью в потомстве от скрещивания различных мутантов фага λ с фагами дикого типа 434, 21 и 82. Какой из этих фагов наиболее близок фагу λ? Что вы можете сказать относительно генетического контро-

Скрещивание	Мутанты фага λ				
	m_5	co_2	*c*	co_1	*mi*
434 × λ	+	+	–	+	+
21 × λ	+	+	–	–	+
82 × λ	+	–	–	(+)	+

(+) негативные колонии более мутные, чем co_1, но не такие, как у фагов дикого типа.

15–1215

ля иммунности и лизогенизации, судя по этой таблице и по трем предыдущим задачам?

7.16. В результате рекомбинации между фагом λ и фагом 434 иногда образуется гибридный фаг, в котором хромосома фага λ обладает иммунными свойствами фага 434. Такой рекомбинант обозначается символом λimm^{434}; он способен к росту на хозяине с профагом λ в геноме, но не на хозяине с профагом 434. Ген *cy* локализован между геном *O* и участком, определяющим иммунные свойства. Для того чтобы определить порядок мутаций 2001 и 42 в гене *cy*, были поставлены два скрещивания. Потомство высевали на *E. coli* ($\lambda imm^{434}Oam_{29}$). Каков порядок мутаций?

Скрещивания	Рекомбинанты
$\lambda imm^{434}cy2001 \times \lambda cy42\ O\ am\ 29$	$cy^+O^+/O^+ = 40/1728 = 2{,}3\%$
$\lambda imm^{434}cy\ 42 \times \lambda cy\ 2001\ O\ am\ 29$	$cy^+O^+/O^+ = 10/5300 = 0{,}19\%$

По *Jones M. O., Herskowitz I.* (1978). Virology, **88**, 199.

7.17. Мутация фага λ*can1* делает возможной лизогенизацию мутантами λ*cIII*. Другими словами, λ*cIIIcan1* образует мутные негативные колонии. λcan^+ можно отличить от λ*can1* при посеве на клетки *E. coli* штамма WA8067: негативные колонии λcan^+ чуть более прозрачны, чем у λ*can1*. На основании приводимых ниже результатов скрещиваний определите положение *can1* относительно мутаций *cy*, картированных в предыдущей задаче. Потомство высевали на *E. coli* Su^- ($\lambda imm^{434}Oam29$).

Скрещивание	Рекомбинанты
$\lambda imm^{434}can\ 1 \times \lambda cy\ 2001\ O\ am\ 29$	$can^+cy^+O^+/O^+ = 1/1856 = 0{,}05\%$
$\lambda imm^{434}cy\ 2001 \times \lambda can\ 1\ O\ am\ 29$	$can^+cy^+O^+/O^+ = 18/2236 = 0{,}81\%$
$\lambda imm^{434}can\ 1 \times \lambda cy\ 42\ O\ am\ 29$	$can^+cy^+O^+/O^+ = 12/3933 = 0{,}31\%$
$\lambda imm^{434}cy\ 42 \times \lambda can\ 1\ O\ am\ 29$	$can^+cy^+O^+/O^+ = 0/1221 = 0{,}08\%$

По *Jones M. O., Herskowitz I.* (1978). Virology, **88**, 199.

7.18. Прерывание скрещивания путем искусственного лизиса клетки на той стадии, когда в ней содержится всего около десятка фаговых частиц, служит одним из способов демонстрации кольцевой структуры генетической карты фага Т4. Если лизис проходит нормально, каждая клетка содержит около 200 фагов-потомков, и уже невозможно наблюдать сцепление между сравнительно удаленными маркерами, а именно это необходимо для доказательства кольцевой структуры. Исходя из содержащегося в тексте главы обсуждения динамики скрещивания фагов, сформулируйте гипотезу, объясняющую эти наблюдения. Как должно было бы влиять на наблюдаемые частоты рекомбинации прерывание нормального лизиса клеток в соответствии с вашей гипотезой? Лизис клеток не происходит, когда оба родительских фага мутантны по соответствующему гену (*e*). Потомство фага может быть извлечено из клеток посредством искусственного лизиса.

7.19. *E. coli* C служит нормальным хозяином фага дикого типа φX174. У мутантного штамма *E. coli* C_1 поверхность клетки изменена так, что фаг φX не может на ней адсорбироваться и соответственно не может расти и размножаться на штамме *E. coli* C_1. Двойной мутант фага φX, обозначаемый символом H_aH_b, способен адсорбироваться на поверхности клеток штамма *E. coli* C_1 (равно как и на *E. coli* C), инфицировать их и производить потомство. Когда клетки *E. coli* C одновременно заражают фагом дикого типа и H_aH_b, некоторые фаговые частицы в потомстве могут инфицировать клетки *E. coli* C_1, однако их потомство уже лишено способности инфицировать клетки *E. coli* C_1. Объясните.

8

Бактериальный геном

Генетические исследования организации генома бактерий начались вскоре после того, как было показано, что именно ДНК является веществом наследственности у пневмококков. Бактерии, так же как и вирусы, представляют генетикам возможность работать с популяциями колоссальной численности, затрачивая на эксперимент сравнительно небольшое время. Описываемые в этой главе методы отбора позволяют выявлять и изучать очень редкие генетические события. Объектом наиболее обширных и тщательных исследований служили и продолжают служить кишечные бактерии *Escherichia coli* и именно на них мы сосредоточим внимание в этой главе. Генетические свойства *E. coli* характерны не только для этого вида бактерий, а методология генетических исследований, разработанная на *E. coli*, создает фундамент и для изучения других видов.

Исследования генетики бактерий внесли очень большой вклад в наши знания о наследственности. Во-первых, они продемонстрировали сколь *разнообразны* генетические процессы, которые могут реализовываться в природе у отдельных видов организмов. Познание этого разнообразия у прокариот проливает свет на возможные механизмы взаимодействия генома человека с геномами вирусов и приводит к переоценке роли многих генетических явлений, наблюдавшихся у эукариотических организмов, но не находивших объяснения. Велика роль генетики бактерий и в изучении регуляции и экспрессии активности генов. Эта тема будет рассматриваться в последующих главах. Механизмы организации этих процессов у сравнительно простых прокариотических организмов закладывают основы для их понимания у более сложно устроенных эукариот.

Как отмечалось в гл. 7, генетический анализ генома вирусов формально развивался аналогично генетическому анализу, используемому при исследовании организмов, имеющих мейоз. Однако, когда этот же подход был использован для анализа мутаций *E. coli*, возникло множество затруднений, пока генетики не осознали, что никакая аналогия между половым процессом у мейотических организмов и у бактерий невозможна. В настоящее время существуют представления, согласно которым бактерия содержит множество генетических элементов, более или менее независимых друг от друга и взаимодействующих между собой посредством механизмов, не находящих формальной аналогии с процессом мейоза. Открытие класса генетических элементов, названных эписомами, (в особенности *F*-эписом) и трансдуцирующих фагов дало возможность успешно применить принципы генетического анализа к бактериям и весьма подробно описать организацию бактериального генома.

Мутанты *E. coli*

Прежде чем обсуждать генетику бактерий, мы должны познакомиться с типами изучаемых мутаций и с используемыми для них обозначениями. *E. coli* дикого типа растет в лабораторных условиях на очень простой среде, единственным органическим составляющим которой служит источник углерода; как правило это глюкоза. Штаммы дикого типа прототрофны (см. главу 4): они способны синтезировать любые сложные органические молекулы, необходимые для их метаболизма и роста. Эти биосинтетические способности (*анаболические функции*) требуют работы (экспрессии) многих существенных (т. е. необходимых для существования бактерий) генов. Многие мутации, нарушающие экспрессию необходимых биосинтетических функций, называются условно летальными (см. главу 7), поскольку бактерии с такими мутациями могут существовать только при добавлении в среду необходимых органических молекул. Такие мутанты называются ауксотрофами (т. е. требующими дополнительного питания). При изучении организации бактериальных генов мы будем рассматривать ауксотрофные мутации только в качестве генетических маркеров. Более подробно они будут обсуждаться в главе 10. Фенотип ауксотрофных бактерий обозначают латинскими буквами, указывающими соединение, которое необходимо добавлять в среду для их нормального роста. Например, Met^-, Thi^- и Pur^- обозначают, соответственно, мутантные штаммы, нуждающиеся в метионине, тиамине и пурине; соответствующие прототрофные фенотипы (дикий тип) обозначаются символами Met^+, Thi^+ и Pur^+.

Мутации в самых различных генах могут давать одинаковые ауксотрофные фенотипы, и соответствующие генотипы обозначают теми же буквосочетаниями, что и фенотипы, но курсивом. Например, мутации *metA* и *metB* – это мутантные аллели генов дикого типа $metA^+$ и $metB^+$, причем каждый мутант характеризуется фенотипом Met^-. Как мы увидим далее, каждый из этих генов дикого типа необходим для биосинтеза метионина.

E. coli может использовать в качестве источника углерода многие органические соединения, более сложные чем глюкоза, поскольку обладает способностью превращать молекулы сложных сахаров в молекулы

глюкозы или других простых сахаров, а также способностью расщеплять другие типы сложных молекул, например, аминокислот или жирных кислот. Такое расщепление сложных молекул называется *катаболизмом*. Мутации, затрагивающие катаболические функции, ограничивают типы молекул, которые могут служить источниками углерода для соответствующего мутанта. Например, мутант с фенотипом Lac^- не способен к росту в условиях, когда единственным источником углерода служит лактоза (молочный сахар), тогда как дикий тип Lac^+ способен утилизировать лактозу. Фенотип Lac^- может возникать в результате мутаций в генах $lacZ^+$ и $lacY^+$, обусловливающих появление мутантных генотипов *lacZ* и *lacY*, соответственно. Заметим, что для того, чтобы определить, способен ли данный штамм к росту на определенной среде, надо знать, затрагивает ли соответствующая мутация анаболическую или катаболическую функцию. Например, мутант Met^- нуждается для нормального роста в среде, обогащенной метионином, тогда как мутант Lac^- не может расти на среде, содержащей в качестве источника углерода только лактозу и нуждается в другом источнике углерода. Оба типа мутаций служат удобными условно летальными генетическими маркерами.

Температурочувствительные мутации широко используются и в генетике бактерий. Необходимые для нормального существования (существенные) гены, которые невозможно выявить посредством ауксотрофных мутаций, обычно могут быть идентифицированы с помощью температурочувствительных мутаций. Примерами жизненноважных функций могут служить функции, связанные с синтезом белков или нуклеиновых кислот из молекул-предшественников – аминокислот или нуклеотидов (подробное обсуждение мутаций, затрагивающих синтез ДНК, содержится в главе 13).

Существуют также мутации бактерий, вызывающие устойчивость к определенным бактериофагам или антибиотикам. Первые из них обычно влияют на способность фага прикрепляться к бактерии-мутанту, поскольку у мутанта несколько изменены белки мембраны. Устойчивые (резистентные) мутанты легко отбираются при посеве клеток, подвергнутых действию какого-либо мутагена, непосредственно на среду, содержащую данный фаг или антибиотик: выросшая бактериальная колония и есть мутант. Мутации, вызывающие устойчивость к определенным антибиотикам, хорошо известны, поскольку они создают серьезную проблему для медицины и здравоохранения. Фенотип устойчивости к фагу T1, обозначается символом $T1^R$ (фенотип чувствительности к фагу – $T1^S$). Соответственно, устойчивость и чувствительность к антибиотику стрептомицину обозначают как Str^R и Str^S. Ген чувствительности к фагу T1 обозначается как *ton*, (ton^+ – синоним $T1^S$; ген чувствительности к стрептомицину – *str* (str^+ – синоним str^S).

Мутантные штаммы легко получить при действии на бактерии дикого типа мутагенных факторов, например, рентгеновских или ультрафиолетовых лучей, или химических мутагенов. Обработанную культуру высевают на пермиссивную среду. Например, если нужно получить ауксотроф по определенной аминокислоте, то сперва подвергнутые действию мутагена бактерии высевают на среду, содержащую все 20 аминокислот. После появления колоний, их перепечатывают на чашку с минимальной средой, для того чтобы определить, какие из этих колоний ауксотрофные (рис. 8.1). Затем каждая из ауксотрофных колоний с пер-

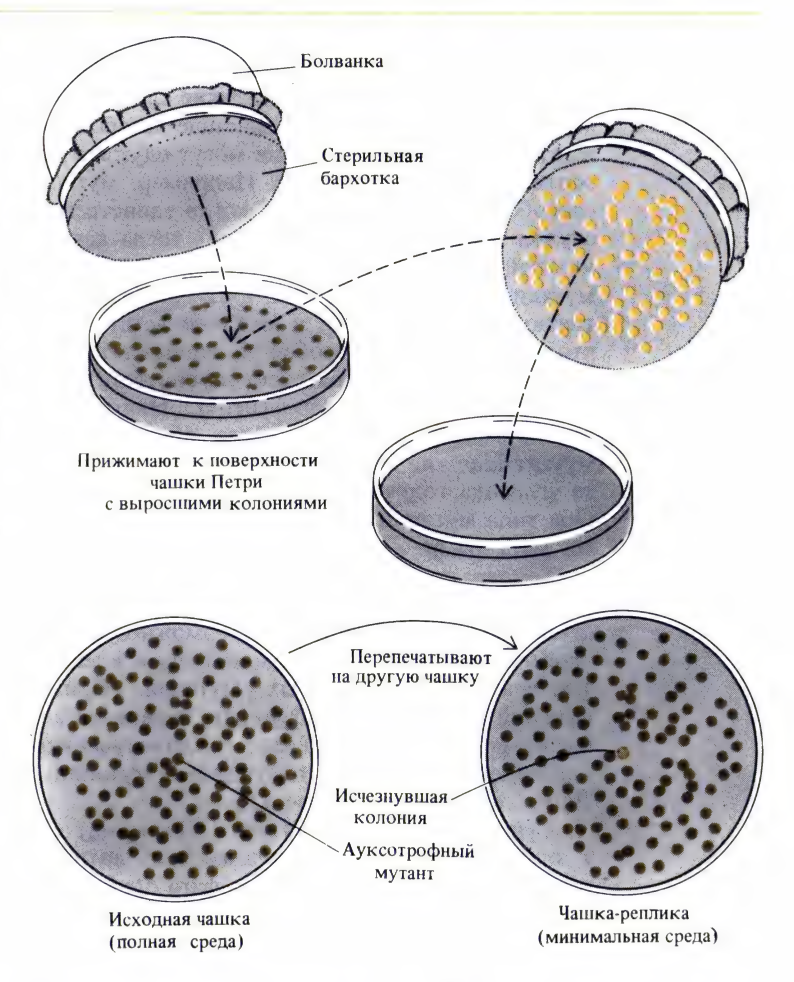


Рис. 8.1. Метод перепечатывания колоний, при котором бактерии быстро переносят с одной питательной среды на другую. На рисунке схематически изображена последовательность операций, позволяющая идентифицировать ауксотрофные мутанты, способные к росту на исходной обогащенной среде, но не образующие колоний на новой (минимальной) среде. [*Stent G. S., Calendar R.*, (1978) Mol. Genetics, 2nd ed., W. H. Freeman, San Francisco.]

миссивной среды «перепечатывается» на 20 чашек Петри с минимальным агаром, к которому добавлено по одной аминокислоте. При этом выясняется, присутствие какой именно аминокислоты необходимо для роста мутанта. Для отбора температурочувствительных мутантов обработанные мутагеном клетки высевают на чашку и инкубируют при 30°С. Выросшие колонии перепечатывают и чашку-реплику инкубируют при 42°С. Колонии, растущие при пермиссивной температуре 30°С, но не способные к росту при 42°С, образованы *ts*-мутантами. Подвергая полученные мутанты повторному (и последующему) воздействию мутагена и производя соответствующий отбор, можно получать штаммы, содержащие по нескольку мутаций.

Генетические элементы *E. coli*

Клетки *E. coli* могут содержать по нескольку различных генетических элементов, каждый из которых способен к саморепликации. Хромосома бактерии – это длинная кольцевая молекула ДНК с мол. массой примерно в $2{,}5 \cdot 10^9$ дальтон, что соответствует $3{,}2 \times 10^6$ н. п. Как уже обсужда-

лось в гл. 4, на бактериальной хромосоме имеется точка (сайт), с которой начинается репликация ДНК, и от которой она распространяется в обе стороны при репликации тета-типа. Генетические факторы, управляющие репликацией бактериальной хромосомы, локализованы в самой хромосоме. Хромосома вместе с сайтом инициации представляют собой самореплицирующуюся генетическую молекулу – *репликон* по терминологии, которую предложили Франсуа Жакоб, Сидни Бреннер и Франсуа Кузин.

В клетках *E. coli* могут содержаться и другие репликоны, способные существовать отдельно от бактериальной хромосомы. Они называются *эписомами*, и *плазмидами*, и представляют собой кольцевые молекулы ДНК различных размеров от 10^3 н. п. до почти трети величины самой бактериальной хромосомы. Одна из наиболее интересных и тщательно изученных эписом получила наименование F-фактора (фактора фертильности). F-фактор определяет половой процесс у *E. coli*. Эписома – это генетический элемент, который может существовать либо в форме репликона отдельно от бактериальной хромосомы, либо встраиваться в бактериальную хромосому и составлять при этом часть репликона бактерии. Эписомой является и бактериофаг λ, способный существовать как вне клетки в форме фага, так и внутри бактериальных клеток, либо в качестве отдельного репликона (при литической инфекции), либо в форме профага, составляя часть бактериального репликона. В противоположность эписомам, плазмиды не встраиваются в другие репликоны, а всегда существуют в форме свободных (автономных) репликонов. Умеренный фаг P1, находясь в состоянии профага, представляет собой плазмиду, существующую отдельно от бактериального репликона. Однако, большинство плазмид не покидают пределов клетки и не образуют внеклеточных форм.

Некоторые эписомы инфекционны, поскольку их копии могут переходить из одной бактериальной клетки в другую, в которой исходно эписом данного типа не было. Генетические функции, необходимые для репликации, инфекционности и способности вытеснять другие эписомы, кодируются эписомальной ДНК. Во многих эписомах содержатся также гены, не необходимые для их существования. Например, некоторые инфекционные эписомы содержат гены устойчивости к определенным антибиотикам. Бактерии, в которые попадает такой *фактор устойчивости*, становятся устойчивыми к данному антибиотику. Имея высокую селективную ценность в современных условиях насыщения антибиотиками, факторы устойчивости быстро распространяются среди различных штаммов и видов бактерий, в том числе патогенных. Это создает серьезные проблемы для медицины. Особенно опасна способность факторов устойчивости накапливать гены, обусловливающие устойчивость к разным антибиотикам, и передавать ранее чувствительным бактериям множественную устойчивость.

F-фактор: генетический элемент, определяющий пол бактерий

F-фактор обладает поразительной способностью определять пол, казалось бы, бесполых бактерий. Его существование было обнаружено генетиками, когда они пытались определить, происходят ли скрещивания

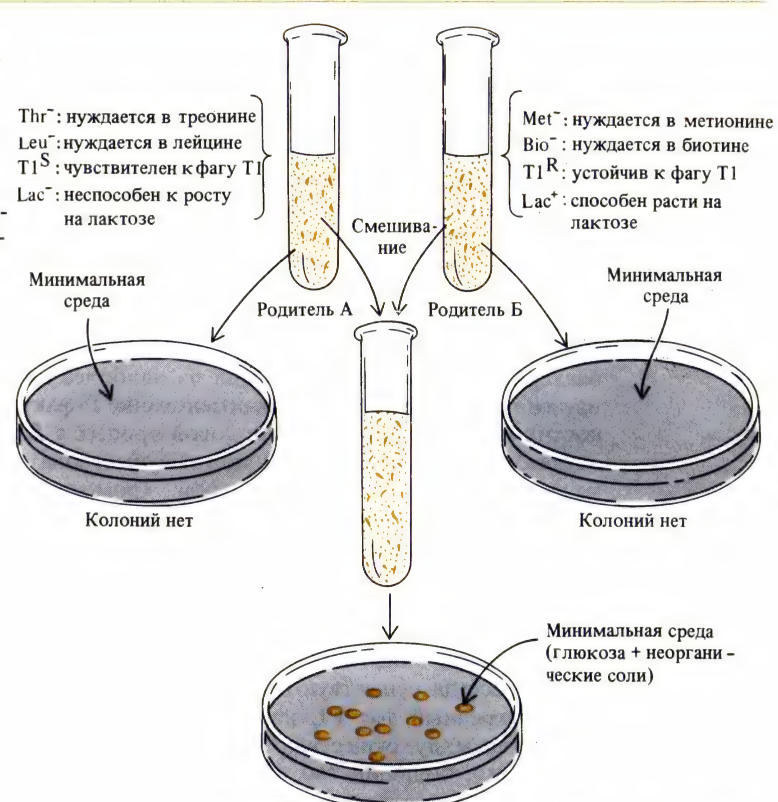


Рис. 8.2. Использование множественно ауксотрофных штаммов для демонстрации скрещивания у *E. coli*. В этом скрещивании *met*$^+$, *bio*$^+$, *thr*$^+$ и *leu*$^+$ – селективные маркеры, а *ton* и *lac* – неселективные маркеры. [*Watson J. D.* (1976). Molecular Biology of the Gene, 3rd ed., W. A. Benjamin, Menlo Park, Calif.] [Имеется перевод: *Уотсон Дж.* 1978. Молекулярная биология гена. М., Мир.]

между различными линиями *E. coli*. Для этого исследовали возможность генетической рекомбинации между различными мутантными штаммами. Множественные ауксотрофы бактерий, полученные посредством нескольких последовательных этапов мутагенеза и селекции, смешивали и смесь высевали на минимальную среду. Появление колоний должно было свидетельствовать о возникновении рекомбинантов дикого типа, как это изображено на рис. 8.2.

Использование множественных ауксотрофов гарантирует, что колонии дикого типа, способные к росту на минимальной среде, возникают именно в результате рекомбинации, а не вследствие обратных мутаций. Если штамм, ауксотрофный по одной аминокислоте, ревертирует к дикому типу с частотой $1 \cdot 10^6$, то появление колоний дикого типа на минимальной среде можно расценить и как результат реверсии, и как результат рекомбинации. Если же мутант ауксотрофен по двум аминокислотам, то частота реверсии к дикому типу должна составлять $10^6 \cdot 10^6 = 10^{12}$. Однако, при использовании таких двойных ауксотрофов в эксперименте колонии дикого типа на минимальной среде образовы-

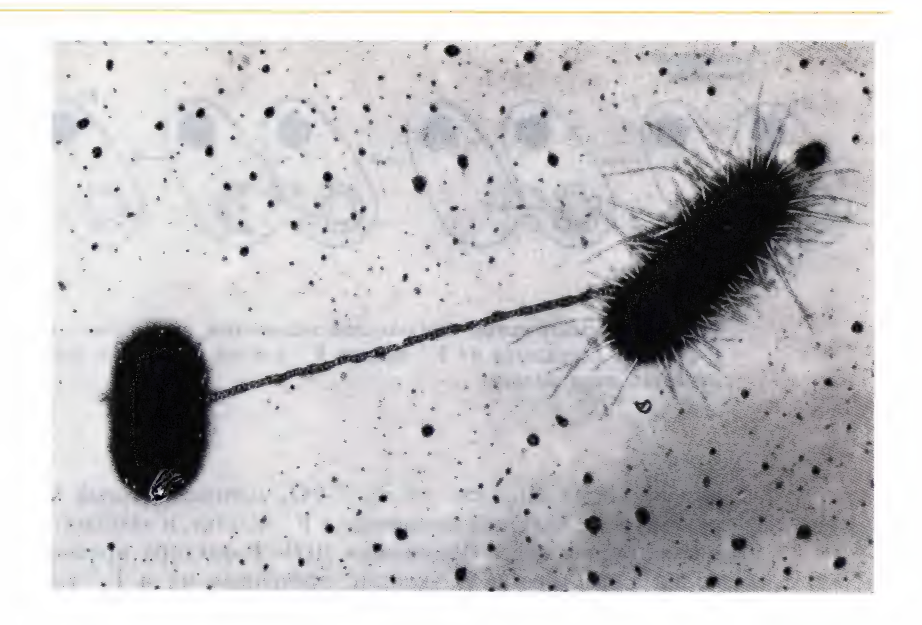


Рис. 8.3. Электронная микрофотография клеток F$^+$ *E. coli* (справа) и F$^-$ (слева). F-пили можно отличить от пилей другого типа, поскольку к ним прикреплены частицы фага, специфичного в отношении F$^+$-штаммов. Известно несколько таких бактериофагов, наследственным веществом у них всех служит РНК. РНК фага вводится в клетку через пили (Prof. *Charles C. Brinton,* Jr. *Judith Carnahan,* University of Pittsburg).

вались с частотой примерно $1 \cdot 10^5$, т.е. много чаще, чем этого можно было бы ожидать, основываясь на предположении об обратных мутациях. Эти эксперименты обнаружили существование у *E. coli* двух половых типов, обозначенных символами F$^+$ и F$^-$. Затем было установлено, что клетки типа F$^+$ содержат F-фактор, или эписому, тогда как в клетках F$^-$-типа эта эписома отсутствует.

Дальнейшие исследования бактерий двух типов привели к поразительному и совершенно неожиданному открытию: оказалось, что F-фактор инфекционен. Когда обладавшие F-фактором и чувствительные к стрептомицину клетки (Str^S, F$^+$) смешивали со стрептомицинустойчивыми бактериями (Str^R, F$^-$), и эту смесь высевали на агар, содержащий стрептомицин, то колонии образовывали, естественно, лишь Str^R-клетки, т.е. клетки, несущие аллель *str*^{R}. Большинство из этих колоний оказалось F$^+$-, а не F$^-$-типа. F-фактор содержит множество генов, сообщающих ему инфекционность. Некоторые из этих генов кодируют белки пилей, структур типа трубочек, расположенных на поверхности F$^+$-клеток (рис. 8.3). F-пили соединяются с соответствующими рецепторами на поверхности F$^-$-клеток, что приводит к образованию цитоплазматического мостика между двумя клетками. В процессе роста F$^+$-клеток F-фактор реплицируется по тета-типу, так же как и бактериальная хромосома. Однако, когда между F$^+$- и F$^-$-клетками возникает цитоплазматический мостик, F-фактор переходит к реплика-

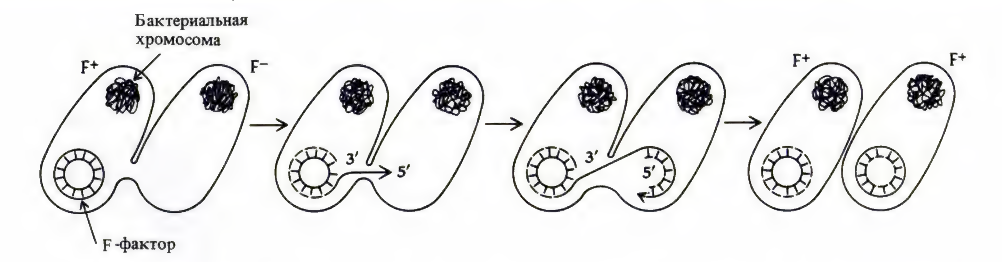


Рис. 8.4. Схематическое изображение механизма, с помощью которого ДНК F-фактора передается от F^+-клетки F^--клетке в процессе репликации по типу катящегося кольца.

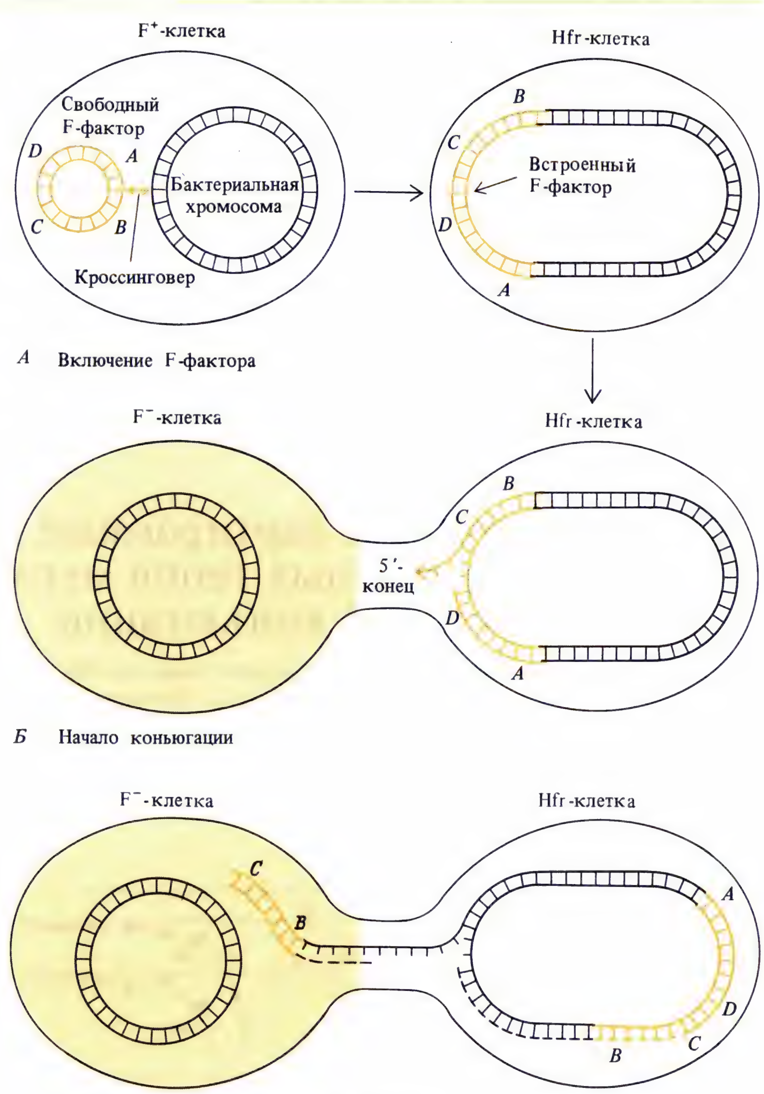
ции по сигма-типу (см. гл. 4). 5′-PO_4 одноцепочечный конец реплицирующегося F-фактора проникает в F^--клетку, и там синтезируется комплементарная цепь. Репликация ДНК F-фактора приводит к переносу копии F-фактора в F^--клетки, превращая их в F^+-клетки (рис. 8.4).

Как уже упоминалось ранее, F-фактор представляет собой эписому, которая может либо существовать самостоятельно, либо встраиваться в репликон бактерии. В встроенном состоянии F-фактор может переносить бактериальную хромосому в F^--клетки. Частота возникновения рекомбинантов дикого типа для генов бактериальной хромосомы при скрещивании F^+- и F^--штаммов очень низка (порядка одной клетки на 10^5 родительских клеток), поскольку лишь небольшое число клеток F^+-культуры участвует в образовании рекомбинантов, хотя частота инфицирования F-фактором довольно высока. Однако, из F^+-культуры можно выделить штаммы, при скрещивании которых с F^--клетками рекомбинанты образуются гораздо чаще (частота рекомбинации $> 10^{-2}$). Эти штаммы обозначаются символом Hfr (от англ. *high frequency recombination* – высокая частота рекомбинации). В них F-фактор в свободном, автономном состоянии отсутствует, он встроен в бактериальную хромосому. Когда клетки Hfr вступают в контакт с клетками F^-, между ними образуется цитоплазматический мостик, называемый *конъюгационной трубкой*, и интегрированный F-фактор инициирует репликацию бактериальной хромосомы по типу катящегося кольца с того сайта, в который он встроен. Эта репликация приводит к переносу бактериальной хромосомы в F^--клетку (рис. 8.5).

Когда копия бактериальной хромосомы клетки Hfr попадает в клетку F^-, становится возможной рекомбинация между генетическими маркерами, содержащимися в хромосоме клетки Hfr, и генами, содержащимися в хромосоме F^--клетки (рис. 8.5). При конъюгации клеток Hfr и F^- часто происходит разрушение соединяющей их конъюгационной трубки и, соответственно, обрыв хромосомы Hfr. В результате в F^--клетку целая Hfr-хромосома попадает довольно редко.

После того, как конъюгация инициирована, возникновение рекомбинантов дикого типа определяется исключительно жизнеспособностью F^--родителя. К такому выводу можно прийти при анализе результатов реципрокных скрещиваний, выполняемых на минимальной среде, содержащей стрептомицин.

Рис. 8.5. Мобилизация бактериальной хромосомы при включении F-фактора в клетке Hfr. При конъюгации репликация хромосомы начинается с встроенного F-фактора. Отрезок F-фактора входит 5′-концом в F⁻-клетку и увлекает за собой ДНК Hfr-клетки. Если конъюгацию прервать до того, как в клетку перейдет вся Hfr-хромосома, то клетка-реципиент сохранит F⁻-тип.



А Включение F-фактора

Б Начало коньюгации

В Перенос одноцепочечной ДНК по механизму "катящегося кольца"

Скрещивание 1: Hfr, Thr^+ Leu^+ $Str^S \times F^-$, Thr^- Leu^- Str^R
Результат: колонии образуют лишь рекомбинанты Thr^+ Leu^+ Str^R.
Скрещивание 2: Hfr, Thr^- Leu^- $Str^R \times F^-$, Thr^+ Leu^+ Str^S.
Результат: колоний нет.

Первое скрещивание показывает, что применение стрептомицина устраняет колонии, которые в противном случае образовались бы из клеток родителя Hfr. Формировать колонии могут только рекомбинанты дикого типа, поскольку родители F^--типа не могут расти на минимальной среде в отсутствие треонина и лейцина. Второе скрещивание показывает, что для образования рекомбинантов необходима жиз-

неспособность родителя F^-, а не Hfr. Рекомбинантные колонии Str^R не образуются, поскольку ген *str*^{R} локализован слишком далеко от сайта, с которого начинается передача хромосомы и потому почти никогда не попадает в F^--клетку.

То, что поступление бактериальных генов из Hfr в F^--клетку происходит последовательно, всегда начиная с сайта интеграции F-фактора в бактериальную хромосому, дает возможность картировать гены по порядку их попадания в F^--клетку (подробнее мы обсудим это в следующем разделе). Как показано на рис. 8.5, проникновение хромосомы в F^--клетку всегда начинается с нуклеотидной последовательности интегрированного F-фактора. При этом в F^--клетку поступает не весь F-фактор. Для того чтобы в клетку попала оставшаяся его часть, необходимо, чтобы в F^- перешла вся Hfr-хромосома. Это случается очень редко из-за спонтанных разрывов конъюгационной трубки, и поэтому большинство отбираемых рекомбинантов остаются принадлежащими F^--типу.

Физическое картирование бактериальных генов методом прерванной конъюгации

Последовательное поступление генов из Hfr в F^--клетки представляет возможность картировать их в бактериальной хромосоме в соответствии с порядком и временем их попадания в клетки. Рассмотрим, например, следующее скрещивание.

Скрещивание 3: Hfr, Thr^+ Leu^+ Az^S $T1^S$ Lac^+ Gal^+, Str^S ×
F^-, Thr^- Leu^- Az^R $T1^R$ Lac^- Gal^- Str^R

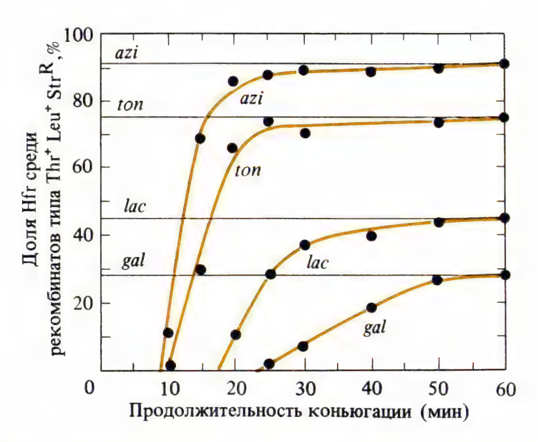


Рис. 8.6. Графики зависимости доли неселективных маркеров среди отобранных рекомбинантов типа Thr^+ Leu^+ Str^R в скрещивании 3 от продолжительности конъюгации. После прерывания конъюгации культуру высевают на селективную среду. Экстраполяция графиков для частоты каждого из неселективных маркеров к оси абсцисс дает время от начала конъюгации, по прошествии которого маркер становится способен к рекомбинации с хромосомой F^--клетки.

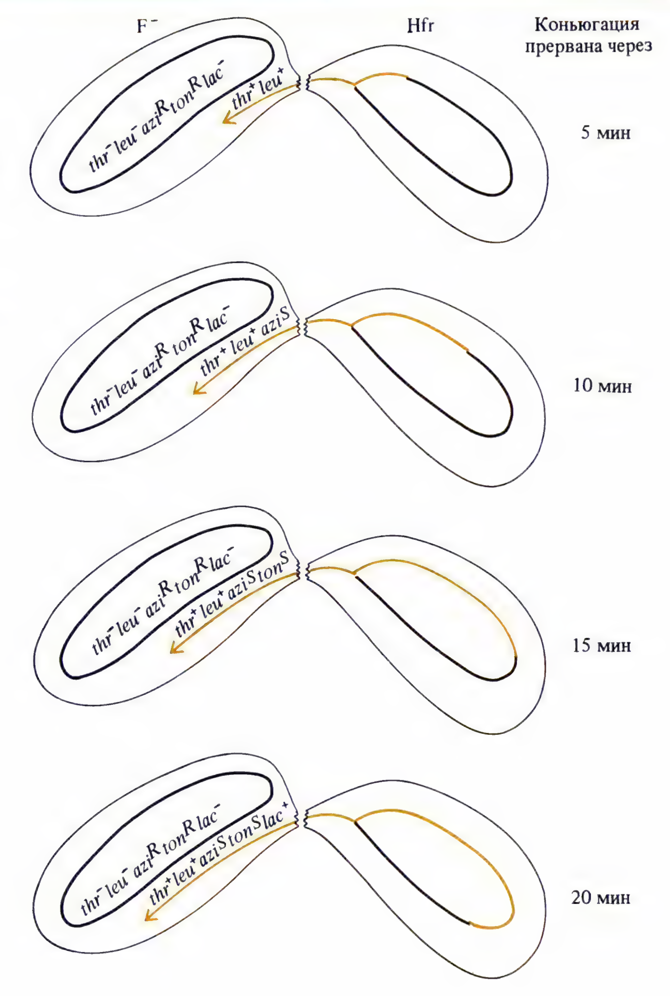


Рис. 8.7. Схема, иллюстрирующая полярность переноса Hfr-хромосомы в эксперименте с прерванной конъюгацией. К рекомбинации с хромосомой F^--клетки способны лишь те гены Hfr-хромосомы, которые к моменту прекращения конъюгации оказались в реципиентной F^--клетке.

Скрещивание между указанными штаммами начинается со смешивания двух культур в момент времени $t = 0$. Через последовательные интервалы времени из смеси отбирают пробы и резко взбалтывают их на мешалке с тем, чтобы разрушить конъюгационные трубки, соединяющие скрещивающиеся клетки. Затем образец высевают на агар со стрептомицином, содержащий в качестве источника углерода глюкозу. На этой среде отбираются рекомбинанты Thr^+ Leu^+ Str^R. Соответствующие три маркера thr^+, leu^+ и str^R, называются *селективными*. Гены, обусловливающие чувствительность к азиду (*azi*), к фагу T1 (*ton*), гены утилизации лактозы (*lac*) и галактозы (*gal*) являются в данном случае *неселективными маркерами*, поскольку среда, на которой выращиваются клетки, не позволяет различать аллели этих локусов у участвующих в скрещиваниях бактерий. Затем отобранные рекомбинанты Thr^+ Leu^+ Str^R пересевают на различные среды, с тем чтобы определить генотипы этих рекомбинантов по неселективным маркерам. Частота соответствующих аллелей откладывается на графике как функция от про-

должительности скрещивания (рис. 8.6). Полученные кривые показывают, что различные неселективные маркеры Hfr становятся способны к рекомбинации с хромосомой F^--клеток по истечении различного времени от начала скрещивания (рис. 8.7). Экстраполяция частоты каждого маркера к нулю указывает время попадания маркера в F^--клетку (рис. 8.6). Эти данные позволяют упорядочить гены по Hfr хромосоме, начиная от точки интеграции F-фактора, и оценить физические расстояния между ними, измеряя эти расстояния в минутах, прошедших с начала скрещивания.

Кольцевая форма генома *E. coli*

Из одного F^+ штамма может возникнуть множество различных штаммов Hfr, для каждого из которых характерна собственная локализация и ориентация F-фактора в хромосоме бактерии (рис. 8.8). Это проявляется в описанных выше опытах с прерванной конъюгацией: в каждом Hfr-штамме передача бактериальной хромосомы начинается с собственной, иной чем у других штаммов точки; различна также и ориентация хромосомы при этом. Для каждого штамма можно установить характер сцепления между генами, расположенными неподалеку от точки, с которой начинается передача бактериальной хромосомы. Совокупность таких данных по множеству различных штаммов Hfr позволяет установить характер сцепления маркеров в хромосоме в целом и построить физическую карту хромосомы *E. coli*. Как показано на рис. 8.9, эта карта имеет форму кольца, что полностью соответствует кольцевой форме бактериальной ДНК.

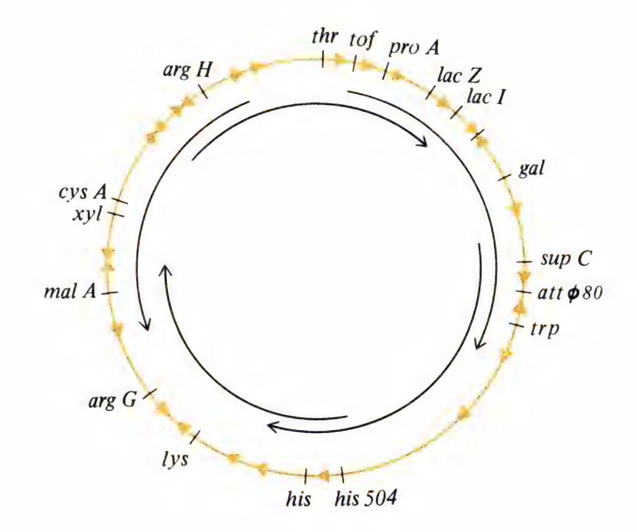


Рис. 8.8. Сайты интеграции F-фактора в хромосому некоторых Hfr-штаммов *E. coli*. Вставки обозначены стрелками, направление которых соответствует направлению передачи хромосомы при конъюгации. Стрелки внутри хромосомы указывают отношения сцепления, установленные для некоторых Hfr-штаммов. Наложение этих стрелок свидетельствует о кольцевой форме генетической карты.

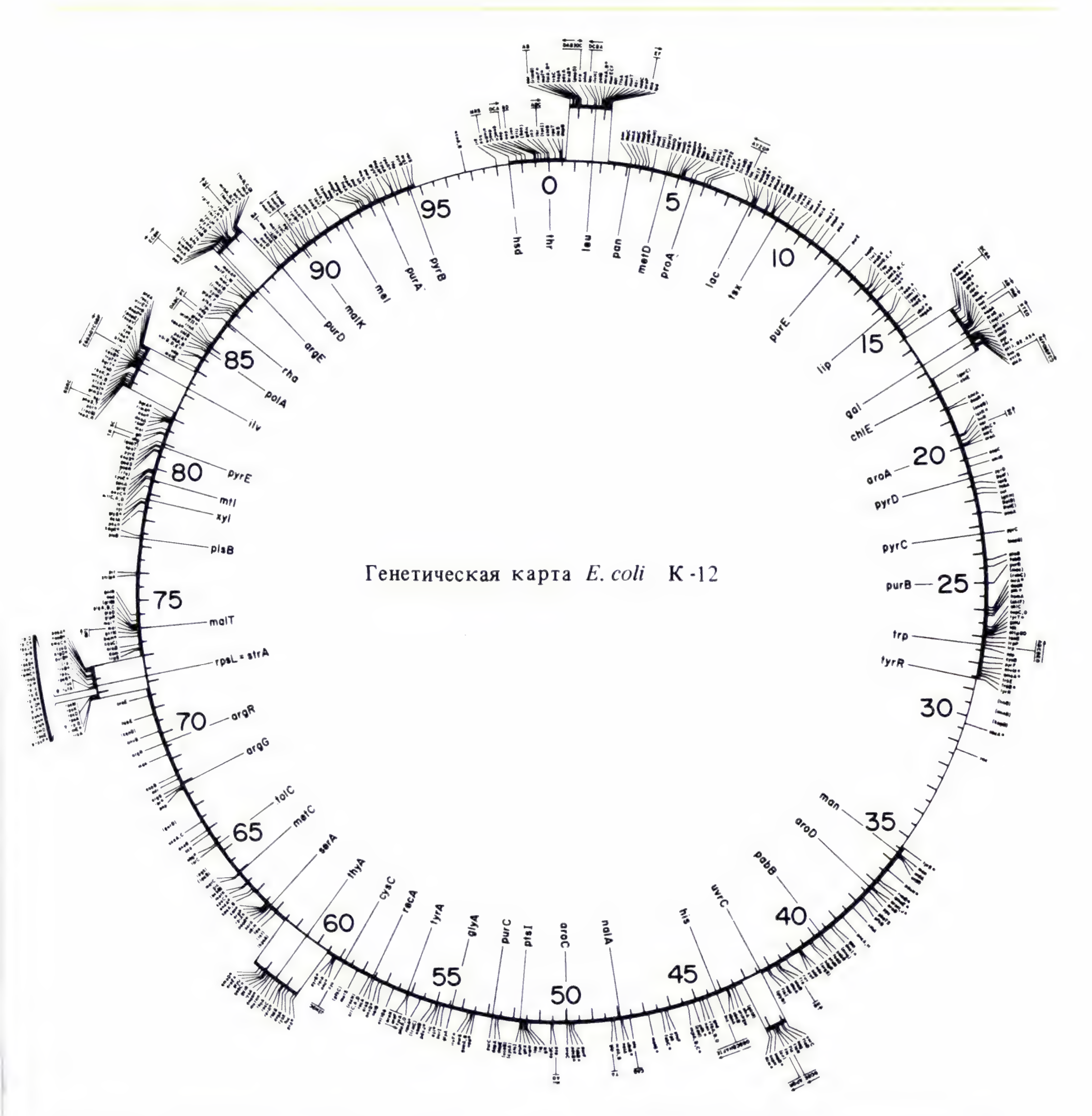


Рис. 8.9. Генетическая карта *E. coli*, построенная методом рекомбинационного картирования и по данным экспериментов с прерванной конъюгацией. [*Bachmann B.J., Low K.B., Taylor A.L.* (1976). Bact. Rev., **40**, 116–167.]

F-штаммы и частичные диплоиды

F-фактор, интегрированный в геном клеток Hfr штамма, иногда может спонтанно «вырезаться» из хромосомы. Клетка при этом из Hfr превращается в F$^+$. Неточное вырезание может привести к тому, что ставший автономным F-фактор захватывает смежный участок бактериальной хромосомы или, наоборот, теряет некоторый участок собственной ДНК

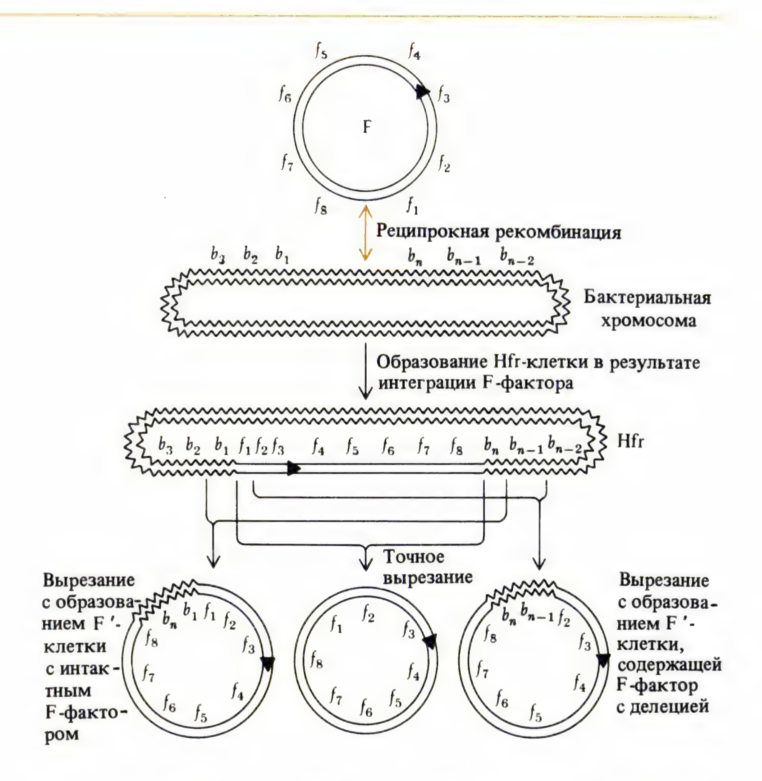


Рис. 8.10. Образование Hfr-штамма в результате интеграции F-фактора в бактериальную хромосому; последующее вырезание приводит к возникновению либо F^+-, либо F′-штамма. Символами *f′* и *b′* обозначены произвольные сайты F-фактора и бактериальной хромосомы, соответственно. Два типа неточного вырезания F-фактора могут приводить, как это указано на рисунке, к возникновению либо F′-штамма с интактным (неповрежденным) F-фактором, либо F′-штамма, содержащего F-фактор с делецией.

(рис. 8.10). Кольцевой F-фактор, включающий в себя бактериальные гены, представляет собой самостоятельный репликон, получивший наименование F′-элемента. F′-элементы обычно, так же как и сам F-фактор, инфекционны, и их копии переносятся в F^--клетки. F′-штаммы отличаются от штаммов Hfr поведением при скрещивании с клетками F^-. Сравните результаты скрещиваний 4 и 5, в которых использовались штаммы Hfr и F′, полученный из него. Смешанные культуры высевали на минимальную среду, содержащую стрептомицин.

Скрещивание 4: Hfr, Thr^+ Leu^+ $Str^S \times F^-$, Thr^- Leu^- Str^R
Результат: отбираются рекомбинанты F^-, Thr^+ Leu^+ Str^R
Скрещивание 5: F′, Thr^+ Leu^+ $Str^S \times F^-$, Thr^- Leu^- Str^R
Результат: отбираются рекомбинанты F′, Thr^+ Leu^+ Str^R.

Колонии, отобранные в четвертом скрещивании, принадлежат F^- типу и не способны передавать гены thr^+ и leu^+ клеткам F^- типа. Напротив, клетки колоний, полученных в пятом скрещивании, содержат активный F-фактор, обеспечивающий им способность скрещиваться с клетками типа F^- и передавать им Thr^+ и Leu^+. Потомство от таких скрещиваний фенотипически будет принадлежать F^+-типу; клетки при этом содержат F′-элемент.

При передаче F′-элемента F^--клеткам возникает так называемая *частичная диплоидность*. Такая частичная диплоидность позволяет осуществлять комплементационный анализ различных мутантов и выявлять доминантность или рецессивность различных аллелей определенных генов. Примеры использования результатов таких исследований приводятся в гл. 15.

В частично диплоидной клетке рекомбинация может происходить между генами бактерии, входящими в состав F′-элемента, и генами гомологичного участка бактериальной хромосомы. Единичный кроссинговер приводит к включению F′-элемента в бактериальную хромосому и образованию клетки типа Hfr с дупликацией генов, содержащихся в F′-элементе. Двойной кроссинговер приводит к образованию клетки F′-типа, в которой произошел обмен маркерами между бактериальной хромосомой и F′-элементом.

Подвижные генетические элементы (транспозоны)

Привычные представления о стабильности генетической организации были сильно поколеблены в 70-х годах исследованиями подвижных генетических элементов у бактерий. Первые такие элементы у бактерий получили название *инсерционных последовательностей* (IS) или вставок. У *E. coli* они были выявлены как причина возникновения определенного типа мутаций. Эти мутации полностью подавляют экспрессию гена, в котором они происходят.

Исследование гетеродуплексных молекул, образованных ДНК мутанта и ДНК дикого типа, показало, что инсерционные мутанты содержат участки ДНК, встроенные в молекулу ДНК дикого типа (рис. 8.11). Было обнаружено, что несколько различных встраивающихся последовательностей могут вызывать мутации многих генов. Некоторые свойства наиболее известных из этих последовательностей представлены в табл. 8.1. Они различаются размером, но имеют некоторые общие черты строения. На концах содержатся одинаковые или почти одинаковые нуклеотидные последовательности, расположенные, однако, в обратном порядке. В случае IS1, например, концевые последовательности содержат по 23 нуклеотида, 18 из которых одинаковы для обоих



Рис. 8.11. Электронная микрофотография гетеродуплексной молекулы ДНК $\lambda gal^+/\lambda gal3$. Одноцепочечная петля (указана стрелкой) – это вставка IS2 в гене gal^+ [*Ahmed A., Scraba D.* (1975). Mol. Gen. Genet., **136**, 233.]

Таблица 8.1. Характеристика инсерционных последовательностей

Название	Число копий в клетке *E. coli*	Длина (н. п.)	Число общих н. п. в инвертированном повторе	Длина повтора в ДНК-мишени (н. п.)
IS1	5–8 копий на хромосому	768	18/23	9
IS2	5 на хромосому, 1 на F	1327	32/41	5
IS3	5 на хромосому, 1 на F	1400	32/38	3 или 4
IS4	1 или 2 копии на хромосому	1400	16/18	11
IS5	Известна только в фагах λ и Mu	1195	15/16	4
IS10		1329	17/23	9
IS50		1533	8/9	9
γδ	1 на F, 1 или более на хромосому	5700	35	5

концов. Кроме того, когда инсерция встраивается в ДНК-мишень, небольшой участок последовательности ДНК-мишени повторяется около каждого конца инсерции. Эта повторяющаяся последовательность ДНК, окаймляющая инсерцию, содержит обычно от 5 до 9 нуклеотидов.

Инсерционные последовательности обладают следующими генетическими свойствами:

1. Наиболее характерная особенность – это способность перемещаться по геному. При этом происходит репликация инсерционной последовательности: исходный экземпляр остается в прежнем сайте, а копия встраивается в мишень. Сайты-мишени, куда встраиваются инсерционные последовательности, вообще говоря, почти не обладают специфичностью. Функции, обеспечивающие способность к перемещению (транспозиции), закодированы в самой инсерционной последовательности и жестко регулируются, поскольку транспозиция представляет собой редкое событие, происходящее на порядок реже, чем сами спонтанные мутации.

2. Инсерционные последовательности могут точно вырезаться; при этом происходит реверсия IS-индуцированной мутации к дикому типу.

3. В сайтах, смежных по отношению к инсерции, возникают делеции бактериальных генов (рис. 8.12).

4. В смежных по отношению к инсерции сайтах происходят инверсии бактериальных генов.

5. Инсерционные последовательности обеспечивают взаимодействие между такими генетическими элементами, как F-фактор и бактериальная хромосома.

Возможные механизмы реализации этих свойств мы обсудим в гл. 14, а здесь лишь прокомментируем последнее свойство.

Физическая карта F-фактора *E. coli* изображена на рис. 8.13, *A*. Она содержит 94 500 н. п., в ее состав входят гены, обеспечивающие конъюга-

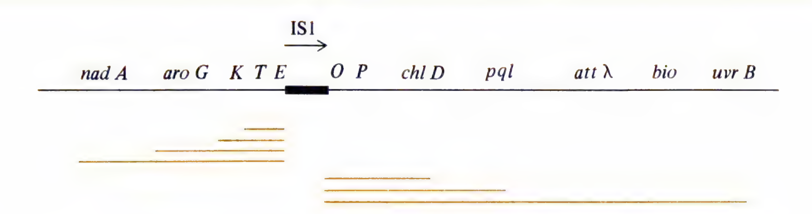


Рис. 8.12. Цветными линиями обозначены делеции, индуцируемые элементом IS1 в *gal*-опероне *E. coli.*

ционный перенос хромосом (гены *tra*), и гены, обеспечивающие репликацию самого F-фактора. Кроме того, карта включает четыре инсерционных последовательности: две IS3′, одну последовательность IS 2 и одну, так называемую γδ. Эти последовательности представляют собой сайты, которыми F-фактор встраивается в хромосому бактерии, что и приводит к возникновению клетки Hfr. Свидетельствующие об этом

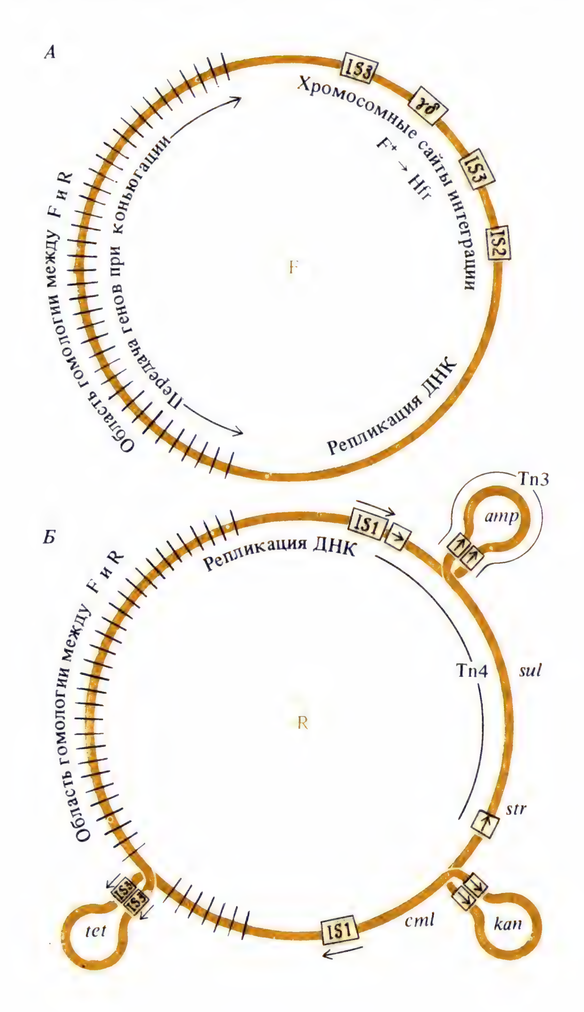


Рис. 8.13. *А*. Физическая карта F-фактора *E. coli*, на которой изображена локализация генов, необходимых для передачи хромосомы, и IS-элементы, ответственные за интеграцию F-фактора в бактериальную хромосому. *Б*. Физическая карта фактора устойчивости, на которой указаны области гомологии с F-фактором и сайты устойчивости к некоторым антибиотикам, окаймленные IS-элементами и образующие транспозоны. Обратите внимание на то, что транспозон Tn3, несущий ген *amp*, представляет собой часть более крупного транспозона Tn4.

данные были получены при изучении структуры F′-элементов посредством гетеродуплексного картирования. В ДНК F′-элемента бактериальная ДНК, интегрированная в F-фактор, отделена с обеих сторон от ДНК F-фактора идентичными инсерционными последовательностями. Способность F-фактора встраиваться в различные участки хромосомы *E. coli* может быть обусловлена двумя событиями: кроссинговером между инсерционными последовательностями, входящими в состав как F-фактора, так и бактериальной хромосомы, либо транспозицией инсерционной последовательности F-фактора в мишень бактериальной хромосомы, приводящей к слиянию двух отдельных кольцевых репликонов в один (см. гл. 14).

Инсерционные последовательности относительно невелики и кодируют лишь функции, необходимые для их транспозиции. Второй класс подвижных элементов, так называемые *транспозоны* (Tn), содержат кроме того гены, не имеющие отношения к транспозиции, но сообщающие важные свойства клеткам бактерии-хозяина. Структурные свойства некоторых транспозонов представлены в табл. 8.2. Некоторые транспозоны, например Tn5, содержат на каждом конце известную инсерционную последовательность. Эти последовательности могут быть как одинаково, так и противоположно направленными. Другие транспозоны на концах содержат простые инвертированные повторы, по размерам близкие инсерционным последовательностям. Тот факт, что две одинаковые инсерционные последовательности могут функционировать согласованно, обеспечивая транспозицию инвертированного участка ДНК, как в случае Tn5, свидетельствует о том, что другие транспозоны, в настоящее время устроенные по-другому, могли эволюционно возникнуть из такой структуры в результате утраты большей части внутренних участков исходной предковой инсерционной последовательности. Так же как и в случае инсерционных последовательностей, перемещение транспозонов приводит к образованию повторов в последовательности ДНК-мишени по обоим концам транспозона.

Впервые транспозоны были обнаружены, когда оказалось, что некоторые гены устойчивости к антибиотикам связаны с инфекционными *факторами устойчивости*. Общая структура факторов устойчивости изображена на рис. 8.13, *Б*. При исследовании гетеродуплексной ДНК, образованной ДНК F-фактора, и фактора устойчивости обнаружена гомология по всей области *tra*-генов, что свидетельствует об эволюционном родстве этих структур. Последовательность ДНК, кодирующая устойчивость к тетрациклину, *tet*, обрамлена элементами IS 3 и встроена в область гомологии фактора устойчивости и F-фактора. В негомологичной области карты локализованы гены, кодирующие резистентность к ампициллину (*amp*), сульфонамиду (*sul*), стрептомицину (*str*), хлорамфениколу (*cml*) и канамицину (*kan*). Эти гены устойчивости порознь или группами обрамлены IS элементами или другими инвертированными повторами (указаны стрелками на рис. 8.13, *Б*). Отдельные гены устойчивости например, *tet* или *amp*, могут переноситься в другие эписомы или плазмиды, а также в хромосомы фагов и бактерий, почему и возник термин транспозон.

Наиболее крупный из известных транспозонов – это умеренный бактериофаг Mu. Mu может в форме профага встраиваться в любое место генома *E. coli*, инактивируя гены, оказавшиеся на месте мишени. При литическом развитии Mu ДНК для репликации должна быть встроена

Таблица 8.2. Характеристика некоторых транспозонов

Транспозон	Обусловливает устойчивость	Длина (н. п.)	Число общих н. п. в инвертированном повторе	Длина повтора в ДНК-мишени (н. п.)
Tn 1, Tn 2, Tn 3	К ампициллину	4975	38	5
Tn 4	К ампициллину, стрептомицину, сульфонамиду	20 500	мало	Включает Tn 3
Tn 5	К канамицину	5400	8/9	9 Концы Tn 5 представляют собой противоположно ориентированные инсерции IS50
Tn 6	К канамицину	4200		
Tn 7	К триметоприму, стрептомицину	14 000		
Tn 9	К хлорамфениколу	2638	18/23	9 Концы Tn 9 представляют собой одинаково ориентированные инсерции IS1
Tn 10	К тетрациклину	9300	17/23	9 Концы Tn 10 представляют собой противоположно ориентированные инсерции IS10
Tn 204	К хлорамфениколу	2457	18/23	
Tn 402	К триметоприму	7500		
Tn 501	К ионам ртути	7800	38	
Tn 732	К гентамицину, тобрамицину	11 000		
Tn 903	К канамицину	3100	1050	9
Tn 1681	К теплоустойчивому энтеротоксину	2088	18/23	9 Концы Tn 1681 представляют собой инсерции IS1
Бактериофаг Mu		38 000	нет	5

в хромосому хозяина. Выделенная из фага Mu ДНК содержит, кроме линейного генома фага, присоединенные к каждому его концу короткие случайные последовательности ДНК бактерии-хозяина. В случае, когда участок бактериальной хромосомы заключен между двумя Mu-геномами, он может транспозироваться целиком.

Интересно, что впервые подвижные генетические элементы были описаны Барбарой Мак-Клинток еще в 1951 году на кукурузе. Она назвала их *контролирующими элементами*, поскольку они встраивались по соседству с некоторыми генами, в частности, генами, определяющими пигментацию зерен, и оказывали влияние на этот признак растения. Мак-Клинток описала также способность контролирующих элементов

перемещаться по геному. В настоящее время стало ясно, что подвижные генетические элементы составляют неотъемлемую часть генома как прокариотических, так и эукариотических организмов. Описание структуры этих элементов на молекулярном уровне началось с прокариот, поскольку соответствующие методы исследования ДНК прокариотических организмов были разработаны в 70-х годах, тогда как метод рекомбинантных ДНК, позволяющих на том же уровне исследовать ДНК эукариотических организмов, стал доступен лишь в 80-х годах. Вспомним о подвижных элементах в гене *white* дрозофилы (рис. 6.17).

Генетическое картирование *E. coli*

Метод прерванной конъюгации удобен при физическом картировании генов, довольно удаленных друг от друга, но не может использоваться при картировании маркеров, находящихся на близком расстоянии. Такие локусы картируют посредством рекомбинационного анализа, основанного на тех же принципах, которые были использованы при постановке трехфакторных скрещиваний (гл. 5 и 7).

Для рекомбинационного картирования требуется клетка реципиента с кольцевой ДНК хромосомы и ДНК донорной клетки. ДНК клетки-донора может вводиться в клетку реципиента различными способами: с помощью Hfr-хромосомы (при *конъюгации*), вместе с фагом-вектором (*трансдукция*), или путем прямой передачи ДНК из клетки донора в клетку-реципиент, как это описано в гл. 4 в отношении пневмококков (*трансформация*). Образующаяся при этом частично диплоидная клетка называется *мерозиготой*. Мерозиготы нестабильны, поскольку донорная ДНК представляет собой фрагмент целого репликона. Генетические

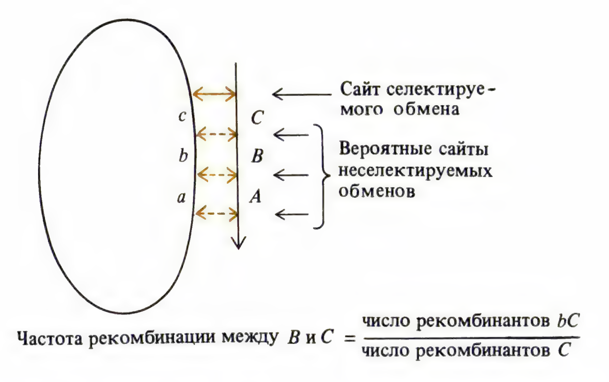


Рис. 8.14. Генетическое картирование посредством рекомбинационного анализа мерозигот, возникающих в результате конъюгации. Отбирается дистальный маркер *C*. Расстояние на генетической карте между *B* и *C* определяется как умноженное на 100 отношение числа рекомбинантов *bC* к числу рекомбинантов *C*. Поскольку в отличие от скрещивания между мейотическими организмами, реципрокные рекомбинанты в таком скрещивании не образуются, расстояния на генетической карте, определяемые таким образом, не аналогичны расстояниям, определяемым при скрещивании мейотических организмов.

маркеры, содержащиеся в донорной ДНК, могут реплицироваться и сохраниться в потомстве, только если они попадают в репликон клетки-реципиента в результате рекомбинации. Как показано на рис. 8.14, для того, чтобы часть донорной ДНК встроилась в хромосому реципиента и при этом сохранилась кольцевая структура хромосомы, требуется два (или даже несколько) кроссинговеров.

Конъюгационное картирование

Когда производится картирование мерозигот типа F^-, образовавшихся при конъюгации с клетками Hfr, полезно знать порядок попадания фланкирующих маркеров в клетку F^-. Картирование выполняется посредством отбора по дистальному маркеру *C* (рис. 8.14). Эта процедура гарантирует участие в конъюгации всех интересующих нас маркеров. Частота появления неселективных маркеров у отобранных рекомбинантов используется для определения расстояния на карте от неселективного маркера до *C*, как это изображено на рис. 8.14. Например, тесно сцепленные мутации, влияющие на способность утилизировать лактозу в качестве источника углерода (*lac Y*, *lac Z* и *lac I*) в реципрокных скрещиваниях 6 и 7 передаются определенным штаммом Hfr после маркера pro^+, но до маркера ade^+.

Скрещивание 6: Hfr, $Y_R^- Z_4^+ I_3^+ ade^+ str^S \times$
F$^-$, $Y_R^+ Z_4^- I_3^- ade^- str^R$

Скрещивание 7: Hfr, $Y_R^+ Z_4^- I_3^- ade^+ str^S \times$
F$^-$, $Y_R^- Z_4^+ I_3^+ ade^- str^R$.

Рекомбинанты $ade^+ str^R$ отбираются при посеве на агар с глюкозой и стрептомицином. Представленные в табл. 8.3 данные основаны на анализе генотипа более чем 10 000 таких рекомбинантных колоний, от-

Таблица 8.3. Частоты неселективных маркеров среди рекомбинантов $ade^+ str^R$, образуемых мерозиготами

Скрещивание 6						Скрещивание 7					
Hfr	Y_R^-	Z_4^+	I_3^+	ade^+	str^S	Hfr	Y_R^+	Z_4^-	I_3^-	ade^+	str^S
F$^-$	Y_R^+	Z_4^-	I_3^-	ade^-	str^R	F$^-$	Y_R^-	Z_4^+	I_3^+	ade^-	str^R
Участок:	1	2	3	4		Участок	1	2	3	4	

Скрещивание 6. Среди рекомбинантов $ade^+ str^R$ (кроссинговер в 4):

А. 22% – $Y_R^+ Z_4^-$ (кроссинговер в 2 или 3)

Б. 2,3% – $Y_R^+ Z_4^+ I_3^+$ (кроссинговер в 1)

В. 0,20% – $Y_R^- Z_4^+ I_3^-$ (кроссинговер в 2 или 3 и слева от *Y*)

Г. 0,048% – $Y_R^+ Z_4^+ I_3^-$ (кроссинговер в 1,2 и 3)

Скрещивание 7. Среди рекомбинантов $ade^+ str^R$ (кроссинговер в 4):

А. 26% – $Y_R^- Z_4^+$ (кроссинговер в 2 или 3)

Б. 1,9% – $Y_R^+ Z_4^+$ (кроссинговер в 2 или 3 и 1 и слева от *Y*)

В. 1,4% – $Y_R^- Z_4^+ I_3^-$ (кроссинговер в 2)

Г. 0,22% – $Y_R^+ Z_4^+ I_3^-$ (кроссинговер в 1 и 2 и слева от *Y*)

По *Jacob F., Wollman E. L.* 1961. Sexuality and the Genetics of Bacteria, Academic Press, New York, p. 229.

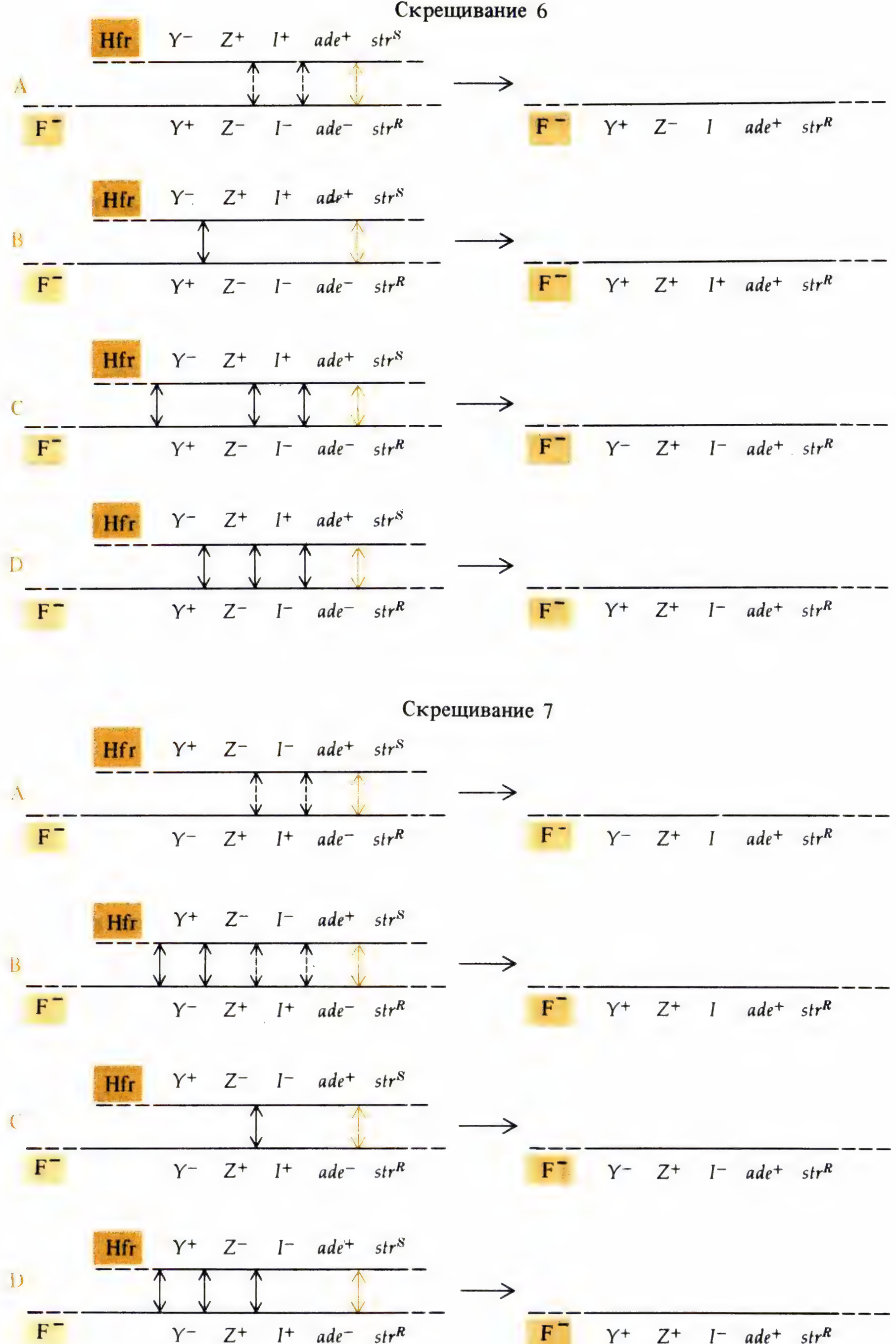


Рис. 8.15. Образование селективных и неселективных рекомбинантных генотипов в скрещиваниях 6 и 7 из таблицы 8.3. Все рекомбинанты содержат ген ade^+ (кроссинговер обозначен цветной стрелкой). Другие возможные обмены обозначены черными стрелками. Пунктирными стрелками обозначены кроссинговеры, положение которых по отношению к гену *lacI* не определено.

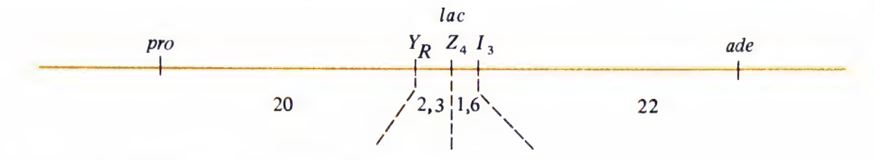


Рис. 8.16. Генетическая карта *lac*-области *E. coli.*

печатанных на чашки с питательной средой, позволяющей идентифицировать различные фенотипы Lac. Самый многочисленный класс рекомбинантов, полученных в этих скрещиваниях, позволяет определить расстояние на карте между *ade* и *lac Z*. В шестом скрещивании это расстояние оценивается в 22 единицы, в реципрокном седьмом скрещивании – в 26 единиц; такое соответствие можно считать удовлетворительным. На рис. 8.15 схематически изображены кроссинговеры, необходимые для возникновения рекомбинантов этого и других типов, представленных в табл. 8.3. Рекомбинанты классов B, C и D, полученные в скрещивании 6 (рис. 8.15), позволяют сделать вывод, что *lac I* лежит между *lac Z* и *ade*, поскольку четырехкратный кроссинговер, в результате которого образуются классы C и D, должен происходить много реже двойного. Сравнение классов C и D с классом B показывает, что по аналогичной причине *lac Z* должен лежать между *lac I* и *lac Y*. Реципрокное скрещивание 7 подтверждает установленную в скрещивании 6 последовательность расположения генов. Полученные в этих скрещиваниях частоты четырехкратного кроссинговера свидетельствуют о существовании высокой отрицательной интерференции (см. гл. 14). На рис. 8.16 изображена рекомбинационная карта, построенная по данным, приведенным в табл. 8.3, и другим данным, полученным при использовании в качестве маркера аллелей локуса *pro.*

Сопоставление физической карты, полученной методом прерванной конъюгации, и генетической карты, построенной на основании данных о частоте рекомбинаций, показывает, что 1 минута продолжительности конъюгации соответствует 20 единицам генетической карты. Полная длина хромосомы *E. coli* составляет 100 минут или 2000 единиц генетической карты. Одна единица карты соответствует примерно 1600 н. п. Очевидно, что рекомбинационное картирование удобно лишь при малых расстояниях между исследуемыми локусами, поскольку маркеры, удаленные друг от друга более, чем на 3 минуты, расщепляются практически независимо, т. е. ведут себя как несцепленные гены.

Трансдукционное картирование

Результаты, получаемые при рекомбинационном картировании мерозигот, желательно подтверждать реципрокными скрещиваниями, как это делалось в случае скрещиваний 6 и 7. Однако создание штаммов Hfr и F^-, необходимых для проведения реципрокных скрещиваний, часто дело непростое, и в большинстве случаев рекомбинационное картирование у *E. coli* производится другим методом, а именно, с использованием мерозигот, возникающих при трансдукции умеренным бактериофагом P1.

После того, как P1 инфицирует чувствительную клетку *E. coli*, развитие может пойти либо по литическому пути, что приводит к появлению

потомства фага, либо по пути лизогенизации. При образовании фагового потомства в головки зрелых частиц с помощью механизма, обеспечивающего заполнение головки T4 максимальным количеством ДНК, упаковываются молекулы ДНК P1 протяженностью примерно 10^5 н. п. В отдельных фагах последовательности нуклеотидов представляют собой циклические перестановки друг относительно друга. Иногда, однако, в головку фага вместо его собственной ДНК упаковывается фрагмент хромосомы клетки-хозяина, разрушенной в процессе лизиса. Частота образования таких дефектных фаговых частиц составляет около 2 : 1000 потомков фага. Дефектные частицы фага, содержащие ДНК *E. coli* могут быть выявлены посредством генетического анализа при наличии в ДНК *E. coli* генетических маркеров. Например, если клетка thr^- «инфицирована» фагом, содержащим фрагмент ДНК *E. coli* с геном thr^+, то ген thr^+ может включаться путем рекомбинации в хромосому бактерии. В результате образуется прототрофный рекомбинант, способный к росту в отсутствие треонина (рис. 8.17). Фаг P1 осуществляет общую (неспецифическую) трансдукцию; это значит, что он способен переносить любые гены бактерий. Такие фаги следует отличать от специфически трансдуцирующих фагов (к ним относится фаг λ), которые переносят лишь те бактериальные гены, которые локализованы неподалеку от сайта интеграции профага.

Когда фаг P1 размножают на клетках $thr^+\ leu^+\ azi^R$, и затем полученным препаратом фага инфицируют реципиента $thr^-\ leu^-\ azi^S$, то лишь 3% от рекомбинантов типа Thr^+ обладают также фенотипом Leu^+, и ни один из них – фенотипом Az^R. Однако, если отбирать рекомбинанты типа Leu^+, то 50% из них составляют Az^R. Следовательно, leu^+ более тесно сцеплен с azi^R, чем с thr^+, и гены, по-видимому, расположены в последовательности $thr^+\ leu^+\ azi^R$. Частоты совместной трансдукции (котрансдукции) соответствующих маркеров можно использовать для определения степени их сцепления. Тот факт, что лишь 3% трансдуцирующих фагов thr^+ содержат также ген leu^+, указывает на то, что эти гены столь удалены друг от друга, что редко оказываются вместе во фрагменте ДНК, попадающем в головку фага P1. На физической карте, полученной методом прерванной конъюгации, эти маркеры расположены на расстоянии около 1/50 от общей длины хромосомы бактерии, что составляет $6{,}4 \cdot 10^4$ н. п. Это находится в хорошем соответствии с данными, согласно которым молекула ДНК фага P1 содержит чуть меньше 10^5 н. п.

Выращивая фаг P1 на различных штаммах бактерий, а затем используя потомство фагов для трансдукции соответствующих маркеров в другие штаммы, легко производить трехфакторные реципрокные скрещивания. В таких экспериментах используется мутант фага P1, *clear*, не способный к лизогенизации бактерий. Подобные опыты по трансдукции с использованием реципрокных трехфакторных скрещиваний позволяют определить последовательность мутантных генов в хромосоме в тех случаях, когда, как в приводимом ниже примере, эксперименты по котрансдукции не позволяют этого сделать. Все маркеры *trp* трансдуцируются вместе более чем в 80% всех случаев. Представленные в табл. 8.4 данные содержат частоты совместной трансдукции cys^+ и четырех тесно сцепленных ауксотрофов Trp^-. Частота совместной трансдукции (котрансдукции) – это частота, с которой клетки реципиента, приобретшие прототрофность по цистеину (cys^+), приобретают

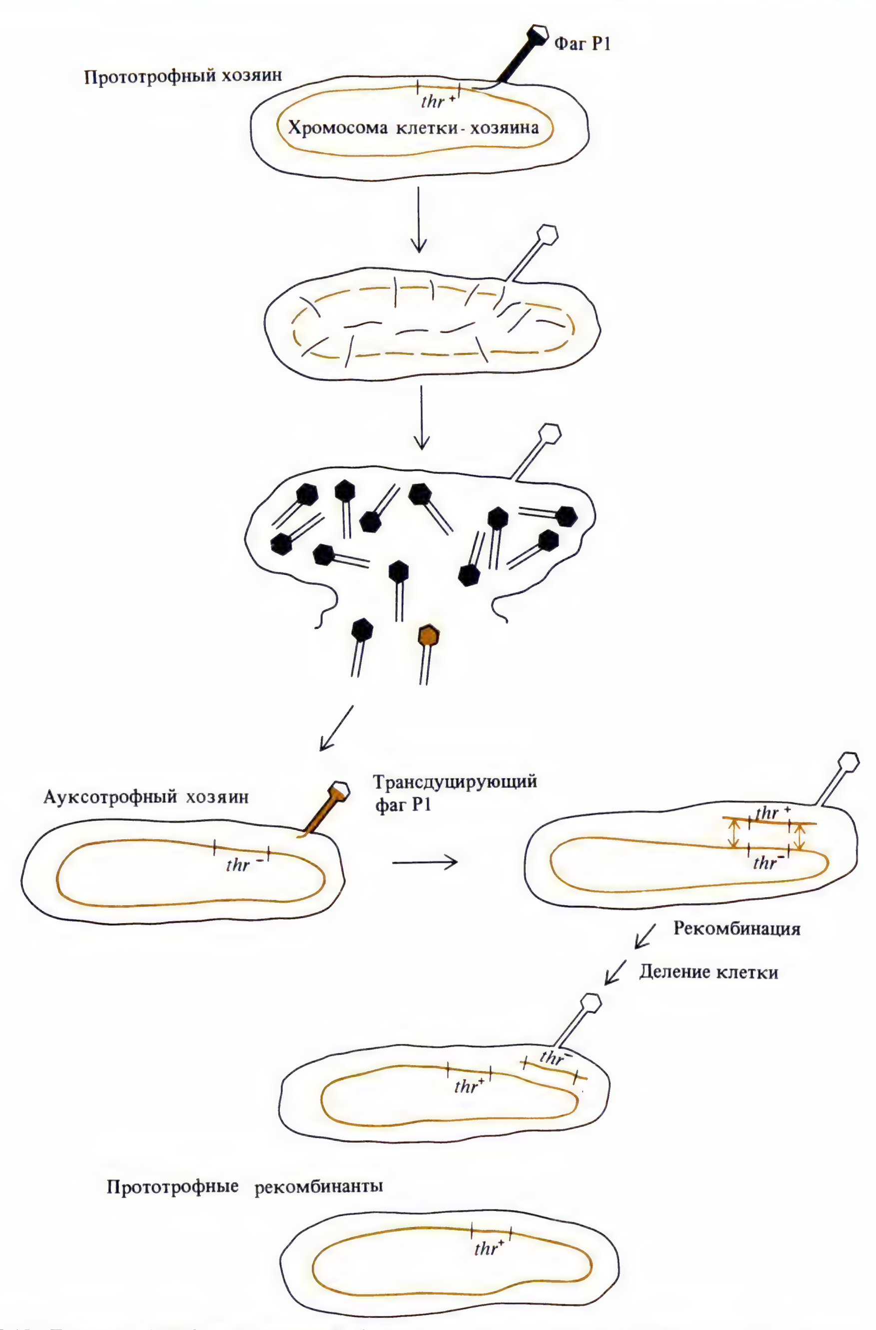


Рис. 8.17. Перенос ДНК из донорной бактериальной клетки в реципиентную в результате трансдукции фагом P1. В популяции трансдуцирующих фагов P1 можно обнаружить фаговые частицы, несущие любые участки бактериальной ДНК донорного штамма. После инфицирования фагом реципиентной клетки среди рекомбинантов посредством специальной селекции можно выделить носителей желаемого участка ДНК донорной бактерии.

Таблица 8.4. Котрансдукция мутаций ауксотрофности по триптофану с маркером *cys*$^+$

Генотип донора	Генотип реципиента	Селективный маркер	Неселективный маркер	Котрансдукция неселективного маркера с *cys*$^+$, (%)
cys^+trpE	cys^-trpE^+	cys^+	*trpE*	63
cas^+trpC	cys^-trpC^+	cys^+	*trpC*	53
cys^+trpA	cys^-trpA^+	cys^+	*trpA*	46
cys^+trpB	cys^-trpB^+	cys^+	*trpB*	47

По *Yanofsky C., Lennox E.S.* 1959. Virology, **8**, 425

одновременно ауксотрофность по триптофану (Trp$^-$). Мерозиготы при этом сперва высевают на минимальную среду, содержащую триптофан. Образовавшиеся колонии перепечатывают на минимальную среду с тем, чтобы выявить не прототрофные, т.е. обладающие фенотипом Trp$^-$. Частота котрансдукции позволяет установить порядок генов в хромосоме *cys-trpE-trpC-*(*trpA, trpB*), но не позволяет уверенно определить взаимное расположение *trpA* и *trpB*, так как различие между 46 и 47% (см. табл. 8.4) статистически недостоверно.

Трехфакторные скрещивания с участием *cys, trpE, trpB*, схематически изображенные на рис. 8.18, подтверждают, что гены расположены в по-

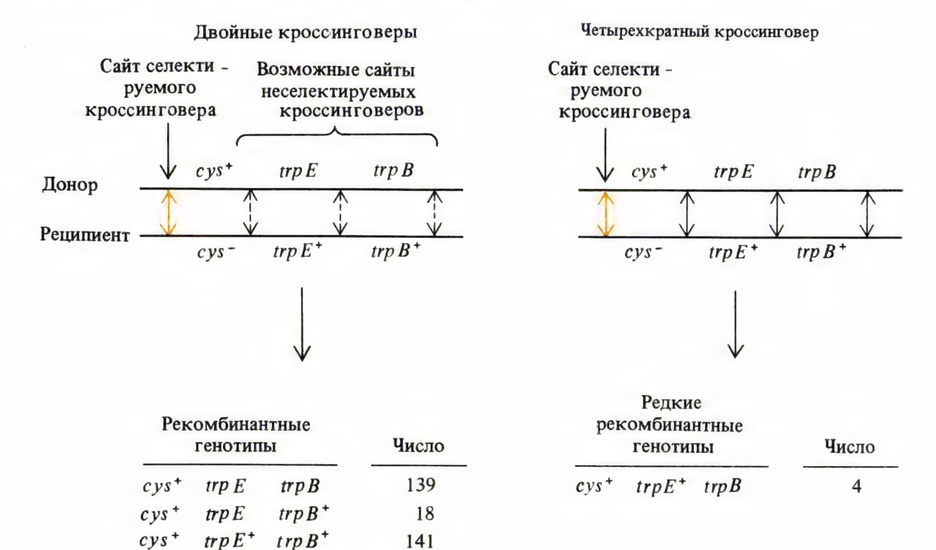
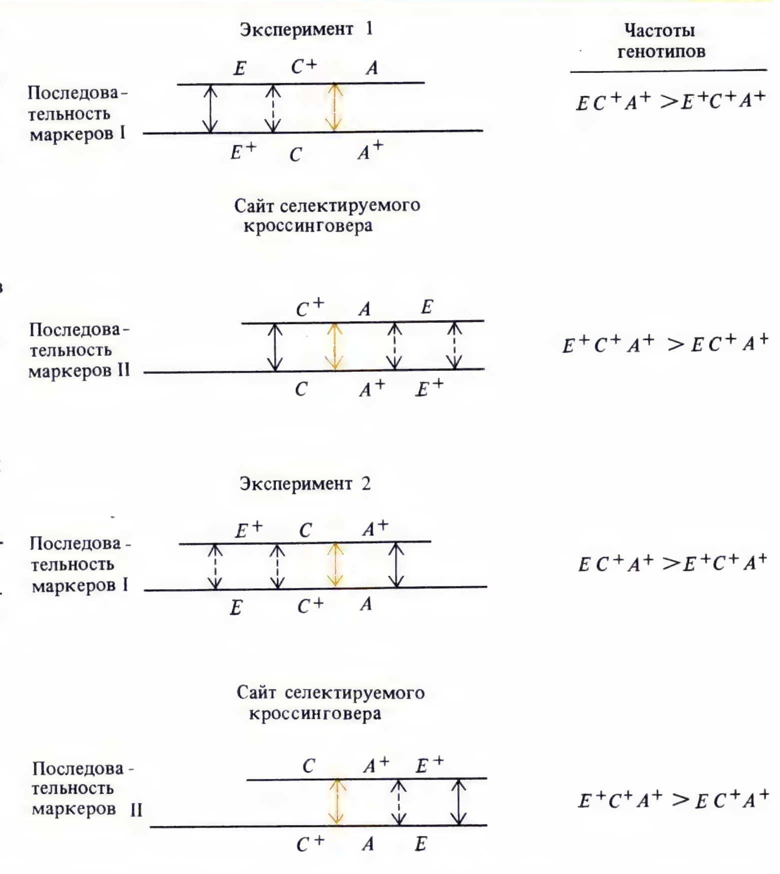


Рис. 8.18. Генетическое картирование посредством рекомбинационного анализа мерозигот, возникших в результате трансдукции. Отбор маркера *cys*$^+$, относительно которого известно, что он тесно сцеплен с *trp*, позволяет выделить класс мерозигот, в которые из донорной клетки попадает участок ДНК, содержащий также и *trp*-маркеры. Кроссинговер, в результате которого это могло произойти, обозначен цветной стрелкой. Взаимное расположение неселективных маркеров *trp* устанавливают затем по частотам более редких рекомбинантных классов, возникающих в результате четырехкратных обменов.

Рис. 8.19. Пример использования реципрокных скрещиваний для установления и подтверждения взаимного расположения маркеров в трехфакторном скрещивании при трансдукции. Для определения последовательности генов выявляют относительные частоты двух указанных рекомбинантных генотипов. Участок, на котором произошел кроссинговер, обозначен цветной стрелкой, а наиболее вероятное расположение второго кроссинговера – черной стрелкой. Менее вероятные локализации кроссинговера указаны пунктирными стрелками.



следовательности *cys-trpE-trpB*. Порядок генов можно установить, зная, что рекомбинантный генотип, появляющийся наиболее редко, возникает в результате четырехкратного кроссинговера. (Сравните частоты генотипов $cys^+ trpE trpB$ и $cys^+ trpE^+ trpB$.) Разделить рекомбинантные классы $trpE trpB^+$, $trpE^+ trpB$ и $trpE trpB$, каждый из которых обладает фенотипом Trp^-, можно, используя селективные среды, в которых отсутствует то или иное промежуточное соединение на метаболическом пути биосинтеза триптофана. Пути биосинтеза и прерывающие их ауксотрофные мутации подробно обсуждаются в главе 10, сейчас мы рассматриваем эти мутации просто как генетические маркеры, позволяющие различать некоторые генотипы.

Трехфакторные скрещивания в результате трансдукции фагом P1 позволяют установить на генетической карте взаимное расположение всех генов ауксотрофности по триптофану: *E*, *C*, *B* и *A*. Результаты реципрокных трехфакторных скрещиваний представлены в табл. 8.5. В этих скрещиваниях вектор селектируемых маркеров задает участок, в котором произошел единичный перекрест. Положение участка, в котором произошел второй перекрест, выявляется при исследовании частот комбинаций неселектируемых маркеров. Условием выбора маркеров для проведения трехфакторного скрещивания служат данные о возможности их котрансдукции, полученные в предварительных экспериментах.

Таблица 8.5. Определение взаимного расположения мутаций ауксотрофности по триптофану путем трехфакторных скрещиваний при трансдукции

Опыт	Генотип донора	Генотип реципиента	Селективные маркеры	Рекомбинантные классы неселективных маркеров		Возможная последовательность	Последовательность, установленная по относительным частотам неселективных маркеров
1	EAC^+	E^+A^+C	A^+, C^+	E	427	$E-C-A$	$E-C-A$
				E^+	120	$C-A-E$	
2	E^+A^+C	EAC^+	A^+, C^+	E	241	$E-C-A$	$E-C-A$
				E^+	65	$C-A-E$	
3	EBC^+	E^+B^+C	B^+, C^+	E	398	$E-C-B$	$E-C-B$
				E^+	83	$C-B-E$	
4	E^+B^+C	EBC^+	B^+	E^+C^+	5	$E-C-B$	$E-C-B$
				EC^+	87		
				E^+C, EC	1561	$C-B-E$	
5	E^+B^+A	EBA^+	B^+	E^+A^+	27	$B-A-E$	
				EA^+	6		
				E^+A, EA	1913	$E-B-A$	$E-B-A$
6	EBA^+	E^+B^+A	A^+, B^+	E	15	$E-B-A$	$E-B-A$
				E^+	107	$B-A-E$	

По *Yanofsky C., Lennox E.S.* (1959) Virology, **8**, 425.

На рис. 8.19 схематически изображены кроссинговеры, приводящие к возникновению рекомбинантов, полученных в экспериментах 1 и 2 из таблицы 8.5. Выбор одной из двух возможных последовательностей генов основывается на следующих рассуждениях: 1) чем ближе неселективный маркер к селективным, тем меньше частота неселективного кроссинговера между ними; 2) четырехкратный кроссинговер происходит реже, чем двойной. Таким образом, поскольку в первом из изображенных на рис. 8.19 эксперименте генотип EC^+A^+ обнаруживается чаще, чем $E^+C^+A^+$, то гены расположены в последовательности $E-C-A$. Правильность такой последовательности подтверждается реципрокным скрещиванием (эксперимент 2), в котором тоже наиболее часто встречается генотип EC^+A^+.

Картированные гены ауксотрофности по триптофану образуют оперон (см. гл. 15), в котором последовательность расположения генов соответствует последовательным биохимическим реакциям, приводящим к синтезу триптофана. Мы уже видели, что мутации, влияющие на утилизацию лактозы, расположены в хромосоме очень близко друг от друга (рис. 8.16). Такое «кучное» расположение генов, определяющих родственные генетические функции – это один из наиболее важных фактов, обнаруженных при изучении генетической организации бактерий. Вспомним, что кучное расположение генов, определяющих родственные функции, наблюдалось у бактериофагов λ и T4 (гл. 7). Такая генетическая организация не случайна: она, по-видимому, отражает фундаментальные основы регуляции генетических функций у прокариотических организмов.

Обзор результатов генетического анализа

В главах 5–8 мы видели, как генетический анализ позволяет определить общую организацию генетического материала у эукариотических и прокариотических организмов, и их вирусов. Комплементационный тест позволяет относить мутации к различным функциональным единицам. С помощью рекомбинационного анализа удается устанавливать взаимное расположение этих единиц и строить генетическую карту, представляющую собой модель хромосомной организации функциональных генетических единиц. Мы увидели, что генетические модели организации наследственного материала очень хорошо соответствуют реальной физической структуре ДНК. Кроме того, мы убедились в том, что генетический анализ может использоваться для изучения изменений тонкой структуры генов – изменений, затрагивающих отдельные пары нуклеотидов.

В последней главе первой части мы рассмотрим, как генетики используют генетические элементы прокариот для исследования тонкой структуры генетической организации прокариот и эукариот. Эти новые методы заложили основы «рекомбинантной революции в исследовании ДНК» и привели к появлению генетической инженерии. Изучив физическую и генетическую организацию генома, во второй части нашей книги мы вернемся к рассмотрению механизмов функционирования генов и к изучению того, каким образом гены определяют фенотип организма.

Литература

Bukhari A.I., Shapiro J.A., Adhya S.L., eds., 1977. DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Jacob F., Wollman E., 1961. Sexuality and the Genetics of Bacteria, Academic Press, New York.

Miller J.H., ed., 1972. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Yanofsky C., Lennox E. (1959). Transduction and recombination study of linkage relationships among the genes controlling tryptophan synthesis in *Escherichia coli*, Virology, **8**, 425–447.

Ключевые слова и понятия

Анаболизм
Ауксотроф
Катаболизм
Инсерция (IS)
Конъюгация
Конъюгационная трубка
Конъюгационное картирование
Котрансдукция
Мерозигота
Неселективный маркер
Общая трансдукция
Перепечатывание колоний
Плазмида
Прерванная конъюгация
Репликон
Селективный маркер

Специфическая трансдукция
Трансдукция
Трансдукционное картирование
Транспозон
Трансформация
Фактор устойчивости к антибиотикам
Эписома
Hfr-штамм
F-фактор
F′-штамм
F^+-штамм
F^--штамм

Задачи

8.1. Последовательность передачи генов у различных Hfr-штаммов *E. coli* различна; для нескольких штаммов она представлена ниже. Постройте на основе этих данных физическую карту бактериального генома.

Hfr-штамм	Последовательность передачи генов
I	*A C E*
II	*D B E*
III	*E B D*
IV	*C A D*

8.2. Для определения взаимного расположения генов *A*, *B*, *C* и *D* на генетической карте использовали метод прерванной конъюгации. Hfr-штамм $leu^+ A^+, B^+, C^+, D^+ Str^S$ передающий ген leu^+ в самом начале скрещивания, скрещивали со штаммом $F^- leu^- A^-, B^-, C^-, D^- Str^R$. Определите взаимное расположение генов *A*, *B*, *C* и *D*, используя гены Str^R и leu^+ в качестве селективных маркеров (рис. 8.20).

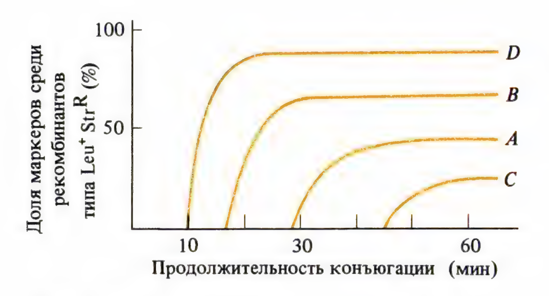


Рис. 8.20. Графическое представление результатов скрещивания.

8.3. Для определения взаимного расположения нескольких ауксотрофных мутаций *E. coli* проводили эксперимент по прерываемому скрещиванию между прототрофным штаммом HfrStr^S и штаммом F^-, A^-, B^-, D^-, Str^R. В качестве селективных маркеров использовали устойчивость к стрептомицину и прототрофность по *D*. Определите расположение генов *A* и *B* относительно *D*, считая, что D^+ передается при скрещивании последним.

Генотип колоний D^+Str^R	Доля колоний D^+Str^R (%)
A^+B^+	22
A^-B^+	10
A^-B^-	68
A^+B^-	0

8.4. Для определения взаимного расположения нескольких ауксотрофных мутаций *E. coli* использовали данные по трансдукции фагом P1. Проанализируйте приведенную таблицу и установите порядок следующих генов: *A*, *B*, *C*, *D* и *F*.

Генотип донора	Генотип реципиента	Селективный маркер	Котрансдукция неселективного маркера дикого типа с селективным маркером (%)
A^+G^+	A^-G^-	A^+	80
A^+D^+	A^-D^-	A^+	30
A^+E^+	A^-E^-	A^+	0
D^+E^+	D^-E^-	D^+	30
D^+F^+	D^-F^-	D^+	5
E^+F^+	E^-F^-	E^+	75

8.5. При скрещивании F^--штамма с различными Hfr-штаммами последовательность переноса генов различна. В таблице приводится порядок переноса различными Hfr-штаммами нескольких генов, расположенных неподалеку от точки начала (0). На основании этих данных постройте физическую карту бактериальной хромосомы.

Hfr-штамм	Порядок переноса генов
H	*O—thr—leu—ari—ton—pro—lac——ade*
4	*O—thi—met—ile—mtl—xyl—mal——str*
6	*O—ile—met—thi—thr—leu—azi—ton*
AB311	*O—his—trp—gal—ade—lac—pro——ton*
AB313	*O—mtl—xyl—mal—str—his*

8.6. Для того, чтобы определить положение гена $arg7^+$ на карте хромосомы *E. coli*, прототрофный штамм Str^SHfr4 (см. условие предыдущей задачи) скрещивали со штаммом F^-,Met^- Mtl^- $Str^R$$arg7^-$. После того как скрещивание прерывалось, образцы культуры высевали на чашки, содержавшие глюкозу в качестве источника углерода, стрептомицин и аргинин (или метионин). По приведенным в таблице данным определите расположение гена $arg7^+$.

Время до прерывания скрещивания (мин)	Число рекомбинантов	
	Arg^+Str^R	Met^+Str^R
0	0	0
6	0	0
8	3	0
10	19	4
11,5	56	28
13	126	62
14,5	217	183

8.7. Студент-генетик получил задание определить положение на карте ауксотрофной мутации, которую он на основании данных по трансдукции считает тесно сцепленной с геном *his*. Он ставит конъюгационное скрещивание штамма Hfr AB313 Str^S,Ade^- Tl^S (см. условие задачи 8.5) с ауксотрофным штаммом F^- Str^R,Ade^+ Tl^R. После прерывания конъюгации образцы суспензии он высевает на среду, содержащую глюкозу и стрептомицин. Рекомбинантов обнаруживается очень мало, и их недостаточно для того, чтобы установить тесное сцепление. Со своими трудностями он обращается к преподавателю. Тот советует ему исключить из среды стрептомицин и повторить эксперимент. Студент пользуется советом и получает надежные данные, показывающие, что ген, положение которого он должен определить, попадает в F^--клетки за две минуты до гена *his*. Объясните, что было неправильно в первом эксперименте, и почему во втором случае эксперимент удался. Предложите другую схему эксперимента.

8.8. Изобразите схематически рекомбинанты, которые могут быть выделены из нового F′-штамма, в котором F′-элемент содержит гены thr^+ leu^-, а бактериальная хромосома – гены thr^- leu^+. Обозначьте положение полового фактора в каждом рекомбинанте.

8.9. Предложите два способа определения того, принадлежит ли отобранная после скрещивания Hfr и F^--штаммов рекомбинантная колония типу F′ или F^-.

8.10. Установлено, что определенный штамм *E. coli*, требующий для роста метионин, содержит в гене *met* элемент IS1, инактивирующий этот ген и вызывающий потребность в метионине. Из этого штамма выделено множество спонтанных мутантов с делециями, затрагивающими смежный по отношению к гену *met* оперон *ilv*. Носители этих делеций, кроме метионина, нуждаются также в изолейцине и валине. Каждый из штаммов с одной из делеций используется в качестве донорного для трансдукции фагом P1 маркеров ilv^+ в реципиентные штаммы ilv^-. Используются реципиентные штаммы $ilvA^-$, $ilvB^-$, $ilvC^-$ и $ilvD^-$. В приводимой таблице указано присутствие (+) или отсутствие (−) рекомбинантов ilv^+ в каждом

опыте. Определите расположение мутаций ilv^- друг относительно друга и относительно гена *met*.

Доноры	Реципиенты			
	$ilv\ A^-$	$ilv\ B^-$	$ilc\ C^-$	$ilv\ D^-$
1	—	+	+	+
2	−	+	+	−
3	−	−	−	−
4	−	+	+	+
5	−	−	+	−
6	−	−	−	−

8.11. Мутанты *thr* и *leu* у *E. coli* – ауксотрофы, требующие для роста треонин и лейцин, соответственно. Мутация *ara3* обусловливает неспособность клеток использовать арабинозу в качестве источника углерода. В приводимой таблице указаны частоты котрансдукции этих генов фагом P1. Какая селективная среда использовалась в каждом случае и какова последовательность генов?

Генотип реципиента	Селективный маркер	Доля колоний, содержащих неселективный маркер (%)		
		leu^+	thr^+	ara^+
	thr^+	4,1	—	6,7
ara 3 leu thr	leu^+	—	1,9	55,4
	$thr^+ leu^+$	—	—	80,0
	ara^+	72,6	4,3	—

8.12. Мутации *ara1* и *ara2* очень тесно сцеплены с *ara3*. Все они делают клетки *E. coli* неспособными к использованию арабинозы в качестве единственного источника углерода. Для того, чтобы установить взаимное расположение этих мутаций, проводили реципрокные трансдукционные скрещивания, результаты которых представлены в таблице. Во всех случаях отбирали рекомбинанты Ara^+ и среди них определяли долю носителей неселективных маркеров leu^+ и thr^+. Каково взаимное расположение этих маркеров?

Реципиент	Донор	Доля колоний, содержащих неселективный маркер (%)	
		leu^+	thr^+
thr ara 1 leu	*ara 2*	64,4	1,2
thr ara 2 leu	*ara 1*	17,4	7,4
thr ara 1 leu	*ara 3*	26,1	6,4
thr ara 3 leu	*ara 1*	52,4	2,4
thr ara 2 leu	*ara 3*	14,3	9,5
thr ara 3 leu	*ara 2*	65,8	2,8

По *Gross Y., Englesberg* (1959) Virology **9**, 314

8.13. Когда в качестве реципиентных используются клетки *ara3*, а донорными клетками для фага P1 служат *ara1*, *ara2* или клетки дикого типа, и отбираются трансдуктанты Ara^+, то на селективной среде наряду с крупными колониями появляются крошечные колонии, неразличимые невооруженным глазом. Сформулируйте гипотезу об их происхождении.

8.14. Клетки некоторых штаммов *Salmonella paratyphi* подвижны, поскольку обладают жгутиками; клетки других штаммов лишены жгутиков и неспособны к самостоятельному движению. Фаг, осуществляющий общую трансдукцию у *Salmonella* (P22), выращивают на подвижных клетках и инфицируют им неподвижные клетки. Когда инфицированные клетки неподвижного штамма высевают на поверхность столбика из мягкого агара, то после инкубации можно увидеть тянущиеся вглубь агара от поверхности цепочки мелких колоний (рис. 8.21).

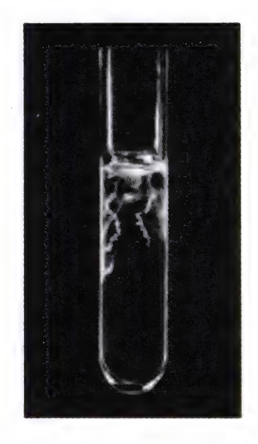


Рис. 8.21. Бактериальные колонии *Salmonella paratyphi* в пробирке с мягким агаром. [*Lederberg J.* (1956). Genetics, **41**, 845.]

В культурах, выделенных из этих колоний, все клетки оказываются неподвижными. Объясните.

8.15. При некоторых скрещиваниях с участием лизогенных штаммов профаги типа λ могут использоваться в качестве бактериального генетического маркера. В таблице представлены результаты скрещивания между нелизогенным [(ly)$^-$] штаммом HfrH,Str^S и штаммами F$^-$ Thr$^-$Leu$^-$Gal$^-$Str^R, лизогенными по одному из нескольких различных профагов, например, F$^-$,Thr$^-$Leu$^-$Gal$^-$Str^R (λ). Отбираются рекомбинанты Thr$^+$Leu$^+$Str^R или Gal$^+$Str^R и среди них определяют долю (ly$^-$)Hfr. О наличии маркера ly$^-$ судят по чувствительности к соответствующему фагу, другими словами, утрата профага рекомбинантом интерпретируется как наличие неселективного маркера. На основании этих данных определите взаимное расположение профагов на физической карте *E. coli* и их положение относительно Thr$^+$Leu$^+$ и Gal$^+$.

Профаг	Доля нелизогенных рекомбинантов	
	Thr$^+$Leu$^+$Str^R	Gal$^+$Str^R
λ	0,16	0,82
21	0,01	0,10
82	0,21	0,89
434	0,11	0,68
424	< 0,01	0,03
381	0,025	0,15

8.16. При скрещивании штамма Hfr, лизогенного по фагу λ, с нелизогенным F$^-$-штаммом может иметь место феномен, называемый *зиготической индукцией*. Что это такое можно понять, сравнивая рекомбинанты, получаемые в реципрокных скрещиваниях между содержащими профаги штаммами HfrHStr^S и F$^-$,Thr$^-$Leu$^-$Ar^{B}Tl^{R}Lac$^-$gal$^-$Str^B, результаты которых приведены в таблице. Основываясь на представленных в таблице данных о частоте возникновения рекомбинантов при зиготической индукции, постройте гипотезу, объясняющую этот феномен, и предложите постановку эксперимента для проверки вашей гипотезы.

Скрещивание	Отношение $\frac{Thr^+Leu^+Str^R}{Gal^+Str^R}$	Селективные и неселективные маркеры в рекомбинантах: *thr$^+$leu$^+$str^R* (селективные)					*gal$^+$str^R* (селективные)				
		Частота неселективных маркеров					Частота неселективных маркеров				
		azi^S	*ton^S*	*lac$^+$*	*gal$^+$*	λ	*thr$^+$leu$^+$*	*azi^S*	*ton^S*	*lac$^+$*	(λ)
HfrH(λ)$^-$ × F$^-$(λ)$^+$	3,7	0,92	0,73	0,49	0,31	0,15	0,75	0,75	0,74	0,74	0,84
HfrH(λ)$^+$ × F$^-$(λ)$^-$	54	0,86	0,60	0,21	0,025	0,001	0,82	0,79	0,78	0,74	0,01

9

Методы работы с ДНК

Наследственная информация кодируется последовательностью нуклеотидов в молекуле ДНК. Любая экспериментальная методика, предназначенная для определения последовательности нуклеотидов, требует химически чистых препаратов ДНК. Слово «чистый» в данном случае означает не только отсутствие примесей других типов молекул, например РНК и белков, но и гомогенность нуклеотидных последовательностей. Все молекулы ДНК в таком образце должны быть одинаковы как по размерам, так и в отношении последовательности нуклеотидов. По этой причине первыми для изучения генетической организации на уровне нуклеотидов были выбраны вирусы прокариотических и эукариотических организмов. Геномы вирусов относительно малы, и вирусные частицы можно довольно легко отделить от клеточного материала еще до химического выделения интактных молекул ДНК из вирусных частиц. Описанное в гл. 7 гетеродуплексное картирование фага λ основано на умении генетиков выделять интактные молекулы ДНК из различных линий фага λ, геномы которых с генетической точки зрения уже изучены. То же самое относится и к исследованиям, показавшим концевую избыточность нуклеотидных последовательностей фагов T2 и T4 и циклические перестановки в их геномах.

Напротив, огромная длина молекул ДНК бактериальных хромосом и хромосом эукариот делает эти молекулы очень уязвимыми в отношении разрывов при их выделении из клеток. Разрывы происходят случайно вдоль двойной спирали, и в результате возникает сложная смесь более мелких молекул ДНК, отличающихся друг от друга длиной и последовательностью нуклеотидов. Извлечь из такой смеси химическими методами информацию об исходной конкретной последовательности нуклеотидов в интактной хромосоме невозможно.

В 1970 году Смит и Вилкокс получили чистый препарат нового типа нуклеазы из бактерии *Haemophilus unfluenzae*. Это событие оказалось решающим для дальнейших исследований. Выделенная ими нуклеаза расщепляла молекулы ДНК, разрывая фосфатные связи не в произвольных местах, а в *определенных последовательностях нуклеотидов*. Это открытие, а также создание методов клонирования относительно небольших фрагментов двухцепочечной ДНК привело к «рекомбинантной революции» в исследованиях ДНК и послужило основой современных генетических и биохимических исследований. Метод рекомбинантных ДНК решил проблему получения препаратов ДНК, содержащих молекулы одинакового размера и с одинаковой последовательностью нуклеотидов.

Прежде чем перейти к подробному рассмотрению этого метода, мы сначала познакомимся с информацией, которую можно получить при случайном расщеплении ДНК и, соответственно, при исследовании неоднородной смеси нуклеотидных последовательностей. Хотя информация, полученная такими методами, носит статистический характер, тем не менее до 1970 г. она играла важную роль в описании общих закономерностей организации последовательностей ДНК многих организмов. Эта информация была получена из теоретических и экспериментальных исследований реассоциации одноцепочечных фрагментов ДНК.

Кинетика ренатурации ДНК

Если комплементарные цепи нативной двухцепочечной ДНК разделить посредством нагревания или в щелочной среде, то при правильно выбранной температуре и концентрациях солей в растворе, они довольно легко снова образуют двойную спираль. Мы уже встречались с несколькими примерами такой реассоциации при обсуждении образования гетеродуплекса ДНК в главах 7 и 8.

В реакции ренатурации, как показано на рис. 9.1, можно выделить две отдельные стадии. Первая стадия – нуклеация – заключается в образовании водородных связей между несколькими, принадлежащими двум раз-

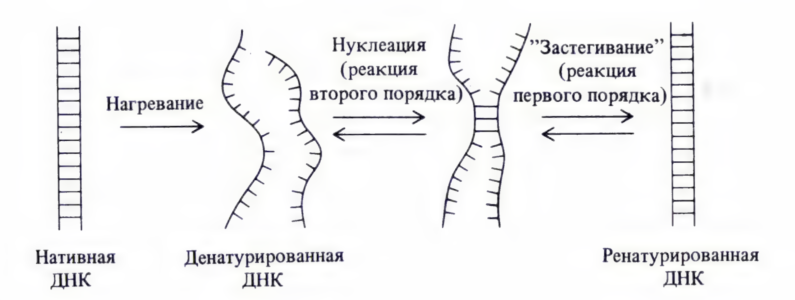


Рис. 9.1. Последовательные этапы денатурации и ренатурации фрагментов ДНК. Ренатурация требует осуществления двух отдельных реакций: (1) нуклеации – образования водородных связей между двумя одноцепочечными фрагментами; это бимолекулярная реакция, т. е. реакция второго порядка; (2) застегивания, при которой водородные связи образуются между всеми основаниями комплементарных нитей; это мономолекулярная реакция, т. е. реакция первого порядка.

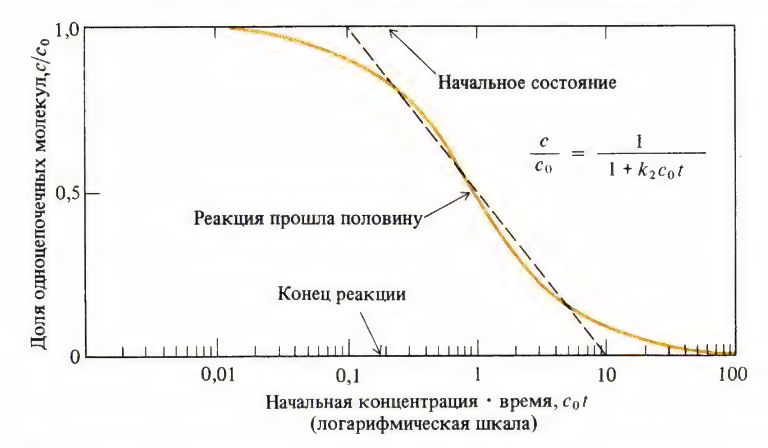


Рис. 9.2. Кинетика идеальной реакции второго порядка при $k_2 = 1$. По ординате отложена доля одноцепочечных фрагментов в реакционной смеси по прошествии t секунд от начала реакции. По абсциссе отложена величина c_0t, где c_0 – начальная концентрация одноцепочечной ДНК в молях нуклеотидов на литр.

ным цепям комплементарными основаниями; остальные взаимно комплементарные основания выстраиваются друг против друга. На данной стадии происходит образование связи между двумя разными одноцепочечными молекулами. Это реакция второго порядка, ее скорость пропорциональна квадрату концентрации ДНК. Вторая стадия – реакция «застегивания молнии», при которой устанавливаются водородные связи между выстроенными друг против друга комплементарными нуклеотидами. Эта стадия представляет собой мономолекулярную реакцию; скорость образования водородных связей пропорциональна концентрации ДНК, т.е. кинетически является реакцией первого порядка. Какая из этих двух стадий идет медленнее и, следовательно, определяет общую скорость ренатурации ДНК, должен решать эксперимент. Показано, что лимитирующей является стадия образования первых связей между цепями.

Зависимость концентрации одноцепочечной ДНК от времени в процессе реакции ренатурации описывается гиперболической функцией (вывод формулы приводится в дополнении 9.1). График зависимости концентрации от времени при $k_2 = 1$ изображен на рис. 9.2. С помощью этого уравнения по времени ($t_{1/2}$), необходимому для ренатурации половины исходного количества ДНК ($c/c_0 = 0{,}5$), можно определять показатель реакции ренатурации ($c_0t_{1/2}$). Эта величина *прямо пропорциональна числу нуклеотидов в неповторяющейся последовательности* ДНК. Эта закономерность иллюстрируется на рис. 9.3 для нуклеиновых кислот, полученных из различных объектов. Другими словами, мы можем определить общий объем уникальной генетической информации, кодируемой ДНК, измеряя значение $c_0t_{1/2}$! Более того, экспериментально определяя кривые ренатурации ДНК, мы можем установить присутствие в геноме повторяющейся генетической информации.

На рис. 9.4 сравниваются кинетика ренатурации ДНК прокариот и эукариот. Обратите внимание на то, что кривая ренатурациии ДНК *E. coli*

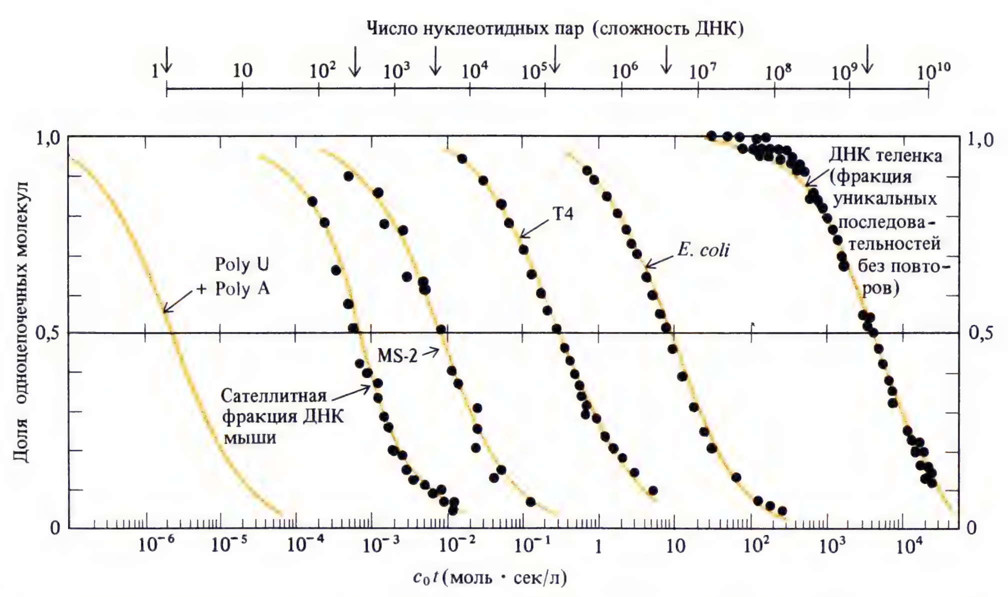


Рис. 9.3. Взаимозависимость между экспериментально определенными значениями $c_0t_{1/2}$ и сложностью (N) использованных в эксперименте фрагментов ДНК. При фиксированном значении c_0 время, необходимое для ренатурации половины молекул, пропорционально N. [*Britten R. J., Kohne D. E.* (1968). Science, **161**, 529.]

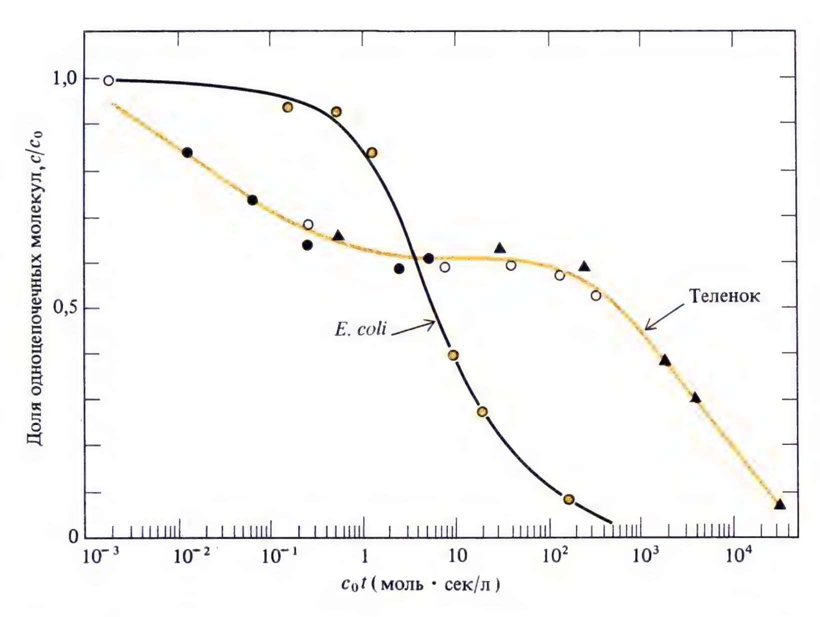


Рис. 9.4. Сравнение кинетики реассоциации фрагментов ДНК *E. coli* и фрагментов ДНК теленка. Форма графика для ДНК *E. coli* очень близка к теоретической кривой, представленной на рис. 9.2, что указывает на то, что ренатурация ДНК происходит при единственном неизменном значении константы скорости реакции k_2. Напротив, график кинетики ДНК коровы по форме качественно отличается от изображенного на рис. 9.2. ДНК теленка содержит последовательности ренатурирующие как быстрее, так и медленнее последовательностей ДНК *E. coli*.
[*Britten R. J., Kohne D. E.* (1968). Science, **161**, 529.]

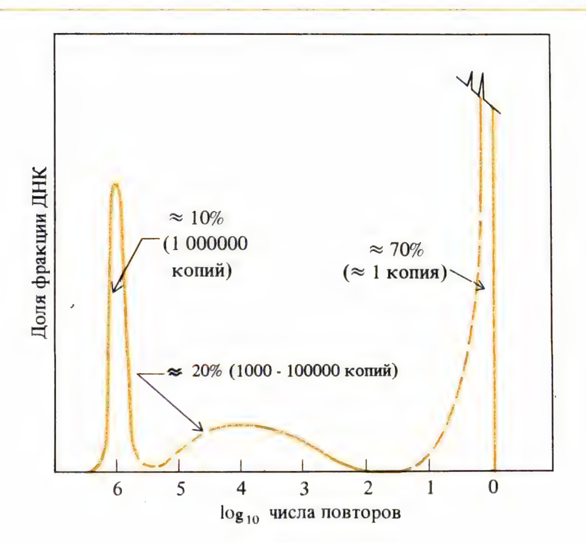


Рис. 9.5. На рисунке в виде спектра изображена частота последовательностей ДНК мыши с различной повторностью. Число копий каждого типа последовательности оценивали по кинетике ренатурации ДНК мыши.

почти тождественна теоретической кривой, представленной на рис. 9.2. Так как теоретическая кривая получена на основе предположения о том, что скорость реакции второго порядка k_2 неизменна, это означает, что ренатурация фрагментированной ДНК *E. coli* характеризуется определенным значением k_2. Что касается ДНК теленка, то, напротив, некоторые фрагменты ренатурируют со скоростью, много большей скорости ренатурации фрагментированной ДНК *E. coli*, тогда как остальная ДНК (около 60%) ренатурирует много медленнее. На основе этих наблюдений можно заключить, что геном эукариот (в данном случае геном теленка) содержит как нуклеотидные последовательности, представленные в геноме лишь в единственном экземпляре, так и различные нуклеотидные последовательности, каждая из которых многократно повторена в геноме. Так, например, основываясь на кривой ренатурации, можно показать, что геном мыши содержит сложный набор нуклеотидных последовательностей, частота представленности которых в геноме схематически изображена на рис. 9.5.

Организация и возможные функции многократно повторяющихся нуклеотидных последовательностей в геноме эукариот были в 60-х годах, после их открытия, предметом активного обсуждения. Около 10% генома мыши составляет совокупность тандемно расположенных последовательностей примерно из 10 нуклеотидов, повторенных 10^6 раз (рис. 9.5). Эти последовательности ДНК локализованы преимущественно в окружающем центромеры гетерохроматине. Подавляющее большинство этих последовательностей, по-видимому, играют какую-то роль в структурной организации хромосом, поскольку они не транскрибируются в последовательности РНК. С другой стороны, большинство последовательностей с не столь высокой повторностью распределены по всему геному и транскрибируются в РНК. Природа этих последовательностей активно изучается методами рекомбинантных ДНК, о которых мы расскажем в этой главе.

Дополнение 9.1 Кинетика ренатурации ДНК

Этапы последовательной денатурации и ренатурации ДНК схематически изображены на рис. 9.1. Ренатурация комплементарных одноцепочечных молекул в двухцепочечную происходит в два этапа: 1) нуклеация (зацепление), 2) застегивание (наподобие застежки-молнии). Поскольку зацепление включает две одноцепочечные молекулы ДНК, скорость реакции пропорциональна квадрату концентрации ДНК (измеряемому по молярности нуклеотидов) и, следовательно, представляет собой реакцию второго порядка. Напротив, в застегивании принимает участие уже единая двухцепочечная молекула, и потому это реакция первого порядка, а с точки зрения механизма – мономолекулярная. Экспериментально ренатурация ДНК идет в соответствии с кинетикой реакции второго порядка. Следовательно, лимитирующей стадией является установление первых связей между одноцепочечными молекулами (зацепление).

Пусть c – концентрация одноцепочечных молекул ДНК в момент времени t, а c_0 – концентрация в начальный момент $t=0$. Тогда уравнение реакции второго порядка, описывающее убывание концентрации одноцепочечной ДНК, имеет вид

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 c^2, \qquad (1)$$

где k_2 – постоянная скорости реакции второго порядка, или

$$-\frac{dc}{c^2} = k_2 dt.$$

Интегрирование этого уравнения дает

$$\frac{1}{c} = k_2 t + const.$$

При $t=0$ $c=c_0$, следовательно, $const = \frac{1}{c_0}$. Подставляя, получаем

$$\frac{1}{c} = k_2 t + \frac{1}{c_0}$$

или

$$\frac{c}{c_0} = \frac{1}{1 + k_2 c_0 t}. \qquad (2)$$

Время, за которое концентрация убывает вдвое (время полуренатурации), обозначается $t_{1/2}$. Из предыдущего уравнения

$$0{,}5 = \frac{1}{1 + k_2 c_0 t_{1/2}},$$

откуда

$$c_0 t_{1/2} = \frac{1}{k_2}. \qquad (3)$$

На рис. 9.2 представлен график зависимости c/c_0 от $c_0 t$, он называется $c_0 t$-графиком.

Ветмур и Дэвидсон показали, что константа скорости реакции второго порядка ренатурации ДНК k_2 обратно пропорциональна N – числу нуклеотидов в неповторяющихся участках нуклеотидной последовательности гаплоидного генома прокариот. Это соотношение задается формулой

$$k_2 = \frac{\alpha\beta^3 L^{0,5}}{N}, \qquad (4)$$

где L – среднее число нуклеотидов в одноцепочечном фрагменте, β – средняя плотность точек, в которых устанавливается связь между двумя цепями, α – коэффициент. Комбинируя уравнения (3) и (4), мы видим, что величина $c_0 t_{1/2}$ прямо пропорциональна N. (a – коэффициент пропорциональности):

$$c_0 t_{1/2} = aN. \qquad (5)$$

Важность уравнения (5) демонстрируется рисунком 9.3, на котором представлены кривые ренатурации фрагментов ДНК, полученных из молекул ДНК различной сложности.

Для молекул ДНК, для которых известны значения L и N, коэффициент пропорциональности a можно определить по

набору значений $c_0t_{1/2}$, получаемых при различных условиях эксперимента (при разных температурах и ионных силах раствора). В этом состоит один из наиболее важных результатов исследования кинетики, а именно: используя один и тот же набор условий эксперимента, можно по значению a рассчитать N для ДНК неизвестной природы.

На рис. 9.4 сравниваются кривые ренатурации бактериальной ДНК и ДНК эукариотических организмов. По форме кривой видно, что ренатурация бактериальной ДНК происходит при неизменном значении константы скорости реакции второго порядка, т.е. в соответствии с уравнением (2). Напротив, кривая ренатурации ДНК эукариотического организма свидетельствует о том, что в процессе ренатурации величина k_2 должна изменяться. Для того, чтобы интерпретировать кривые ренатурации ДНК типа изображенной на рис. 9.4, следует предположить, что в ДНК эукариотических клеток присутствуют различные типы нуклеотидных последовательностей, различающихся сложностью и частотой повторов. Часть ДНК, ренатурирующая медленнее всего (т.е. характеризующаяся наиболее высокими значениями $c_0t_{1/2}$), отвечает уникальным последовательностям, представленным в геноме однократно. Фракции, ренатурирующие более быстро, соответствуют семействам идентичных или очень близких последовательностей, каждая из которых характеризуется определенным значением константы скорости, отражающим сложность (N) семейства. Долю генома, занятую последовательностями того или иного типа, можно оценить по ординате графика, представленного на рис. 9.4.

Рестрикция ДНК и ферменты модификации

Практически все виды бактерий синтезируют по одному или по несколько типов специфических к определенной нуклеотидной последовательности эндонуклеаз, которые делают разрезы в двухцепочечной ДНК. Эти эндонуклеазы называются *рестрицирующими ферментами (или рестриктазами)*, поскольку их основная функция состоит, по-видимому, в ограничении присутствия инородной ДНК в бактериальной клетке (рестрикция буквально означает ограничение). ДНК клеток, синтезирующих ферменты рестрикции, защищена от их действия, потому что клетки синтезируют также модифицирующие ферменты, видоизменяющие структуру сайтов ДНК, узнаваемых ферментом рестрикции. Если клетка с действующей системой рестрикции и модификации инфицируется фагом с заранее не модифицированной ДНК, то вероятность того, что ДНК такого фага инициирует инфекцию, на несколько порядков меньше, чем для фага с модифицированной ДНК. Немодифицированная ДНК фрагментируется, число фрагментов зависит от числа сайтов узнавания в соответствующей молекуле ДНК, а затем фрагменты расщепляются экзонуклеазами. Изредка ферменты клетки-хозяина модифицируют фаговую ДНК до того как ее атакуют рестриктазы. В этом случае фаговая инфекция приводит к лизису клетки. Все потомки такого фага содержат тоже модифицированную ДНК и способны с высокой эффективностью заражать другие бактериальные клетки (с такой же системой рестрикции и модификации). Изучение закономерностей фаговой инфекции и привело к открытию систем рестрикции и модификации ДНК и разработке методов получения чистых препаратов соответствующих ферментов.

Таблица 9.1. Последовательности, узнаваемые некоторыми рестрикционными эндонуклеазами

Микроорганизм	Фермент	Сайт узнавания	Число сайтов узнавания в вирусном геноме: SV40	λ	Аденовирус 2
Escherichia coli KY13	*Eco* RI	5′ G↓A A* | T T C 3′ C T T | A* A↑G	1	5	5
Hemophilus influenzae R_d	*Hin* dII	5′ G T Py↘ | Pu A* C 3′ C A* Pu | ↖Py T G	7	34	>20
	Hin dIII	5′ A*↓A G | C T T 3′ T T C | G A↑A*	6	6	11
Hemophilus parainfluenzae	*Hpa* I	5′ G T T↘ | A A C 3′ C A A | ↖T T G	5	11	6
	Hpa II	5′ C↓C* | G G 3′ G G | C*↑C	1	>50	>50
Hemophilus aegyptius	*Hae* III	5′ G G↘ | C C 3′ C C | ↖G G	18	>50	>50

[1] Звездочками помечены основания, которые могут быть метилированы ферментами модификации. Малыми стрелками указаны разрезы, производимые рестриктазами типа II. Длинная вертикальная линия – ось симметрии. Pu – пурин, Py – пиримидин.

Размеры геномов: SV40 – 5224 н. п.; λ – 48 502 н. п.; аденовирус 2 – 38 200 н. п.

Известно три основных типа ферментов рестрикции. Рестрицирующие эндонуклеазы (рестриктазы) первого типа узнают определенную последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочечную молекулу ДНК неподалеку от этой последовательности, но само место разреза не строго специфично. Эндонуклеазы рестрикции второго типа узнают определенную последовательность и разрезают двойную спираль в определенной фиксированной точке внутри этой последовательности. Эндонуклеазы рестрикции третьего типа узнают нужную последовательность и разрезают двойную спираль, отступив определенное число нуклеотидных пар от ее конца. Мы в основном сосредоточимся на обсуждении свойств эндонуклеаз второго типа, поскольку именно они позволяют, во-первых, получать препараты ДНК, содержащие фрагменты с одинаковыми последовательностями нуклеотидов и, во-вторых, конструировать химерные молекулы ДНК, состоящие из фрагментов, взятых из разных геномов.

Рестриктазы второго типа узнают палиндромные последовательности – последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии. Рестриктазы третьего типа, напротив, узнают асимметричные сайты. В табл. 9.1 представлены сайты узнавания для нескольких рестриктаз. Как указано стрел-

Таблица 9.2. Характеристика сайтов, узнаваемых рестриктазами

Фермент	Сайт узнавания
Тип П (N = 7)	
E k I	
Симметричный (N = 6)	
Bal I	TGG|CCA
Bam HI	G|GATC*C
Bcl I	T|GATCA
Bgl II	A|GATCT
Eco RI	G|AA*TTC
Hin dIII	A*|AGCTT
Hpa I	GTT|AAC
Kpn I	GGTAC|C
Pst I	CTGCA|G
Pvu II	CAG|CTG
Sma I	CCC|GGG
Sac I	GAGCT|C
Sac II	CCGC|GG
Sal I	G|TCGAC
Xba I	T|CTAGA
Xho I	CTC|GAG
Вырожденный симметричный (N = 6)	
Acc I	GT|(A/C)(G/T)AC
Ava I	C|PyCGPuG
Hae I	(A/T)GG|CC(T/A)
Hae II	PuGCGC|Py
Hgi AI	G(T/A)GC(T/A)|C
Hin dII	GTPy|PuA*C
Симметричный (N = 5)	
Asu I	G|GNCC
Ava II	G|G(A/T)CC
Eco RII	|CC*(A/T)GG
Hin fI	G|ANTC

Продолжение табл. 9.2.

Фермент	Сайт узнавания
Симметричный (N = 4)	
Alu I	AG|CT
Fnu DII	CG|CG
Hae III	GG|$\overset{*}{\mathrm{C}}$C
Hha I	G$\overset{*}{\mathrm{C}}$G|C
Hpa II	C|$\overset{*}{\mathrm{C}}$GG
Mbo I	|GATC
Taq I	T|CGA
Симметричный метилированный (N = 4)[††]	
Dpn I	$G^{m}ATC$
Msp I	$C(^{m}C/C)GG$
Type III	
Ассиметричный (N = 5)	
Hga I	GACGCNNNNN|(3′) CTGCGNNNNNNNNNN|(5′)
Hph I	GGTGANNNNNNNN|(3′) CCACTNNNNNNN|(5′)
Mbo II	GAAGANNNNNNNN|(3′) CT T CT NNNNNNN|(5′)

[1] Для ферментов типа II последовательность представлена лишь в одной цепи; комплементарную последовательность можно достроить. Вертикальная линия обозначает положение, в котором разрываются фосфодиэфирные связи. Звездочки указывают основания, которые могут быть метилированы соответствующими ферментами модификации.

[2] Специфический сайт узнавания *Dpn* I содержит метилированный аденин (^{m}A), тогда как сайт *Mbo* I содержит неметилированное основание. *Msp* I узнает указанную последовательность независимо от метилированности внутреннего *C*; *Hpa* II, напротив, узнает ту же последовательность лишь в том случае, если внутренний *C* не метилирован.

ками, точка разреза двойной спирали может совпадать с осью симметрии, а может быть сдвинута относительно нее. В последнем случае образуются комплементарные концы, и между соответствующими основаниями могут сперва устанавливаться водородные связи, а затем посредством ДНК-лигазы происходить сшивка фрагментов с возникновением ковалентных связей между соседними нуклеотидами. Защита от повторного расщепления рестриктазой обеспечивается ферментами модификации, метилирую-

щими некоторые основания в сайте узнавания: соответствующие основания помечены звездочкой. Метилирование происходит после того, как соответствующий нуклеотид включается в ДНК в процессе репликации. Эти ферменты могут действовать либо на неметилированные, либо на полуметилированные сайты; при этом в процессе полуконсервативной репликации образуются полностью метилированные сайты.

Из различных видов и штаммов бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты рестрикции. Выявлено более 80 различных типов сайтов, в которых происходит разрез двойной спирали ДНК. В таблице 9.2 приведена их классификация. Функция некоторых из этих ферментов почти наверняка состоит в защите клетки от присутствия чужеродной немодифицированной ДНК. Однако, в клетках некоторых видов бактерий эндонуклеазы рестрикции хотя и присутствуют, тем не менее, они, по-видимому, не ограничивают проникновение чужеродной ДНК in vivo. Вероятно, эти ферменты осуществляют какие-то иные функции. Как бы то ни было, рестриктазы независимо от их функций in vivo служат мощным инструментом структурного анализа геномов.

Рестрикционный анализ молекул ДНК

Огромные возможности рестриктаз можно проиллюстрировать на следующем примере. Рассмотрим двухцепочечную репликативную форму бактериофага φX174. Он содержит два ковалентно связанных комплементарных кольца, из 5386 нуклеотидов каждое. Чистый препарат ДНК состоит из гомогенных молекул фага. Теперь представим себе, что этот препарат подвергается действию эндонуклеазы, однократно разрезающей двойную спираль кольца без какой-либо специфичности в отношении точки разреза. В результате мы получим препарат ДНК, содержащий линейные молекулы 5386 различных типов, т. е. препарат, совершенно бесполезный с точки зрения анализа нуклеотидных последовательностей. Напротив, если при этом используется рестриктаза *Pst* I, разрезающая палиндромную последовательность GTGCAG (выписана последовательность нуклеотидов лишь в одной цепи двойной спирали), то получается гомогенный препарат линейных молекул ДНК длиной до 5386 нуклеотидов каждая, упорядоченных в одной и той же последовательности. Геном φX174 содержит лишь один сайт, узнаваемый рестриктазой *Pst* I.

В геноме φX174 есть сайты, узнаваемые многими другими ферментами, перечисленными в табл. 9.1. Количество и локализация сайтов для каждой рестриктазы строго определены. Таким образом, воздействие каким-то ферментом приводит к образованию уже известного количества фрагментов ДНК фиксированного размера. Размер каждого типа фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в геле: мелкие фрагменты перемещаются в геле быстрее крупных. Так как фрагменты каждого типа характеризуются одинаковым размером и одинаковой последовательностью нуклеотидов, то нуклеотидную последовательность в каждом из них можно определять отдельно, на выделенном посредством электрофореза в геле препарате. Полную последовательность нуклеотидов в геноме можно затем «собрать» из последовательностей отдельных фрагментов, если знать последовательность самих фрагментов в геноме.

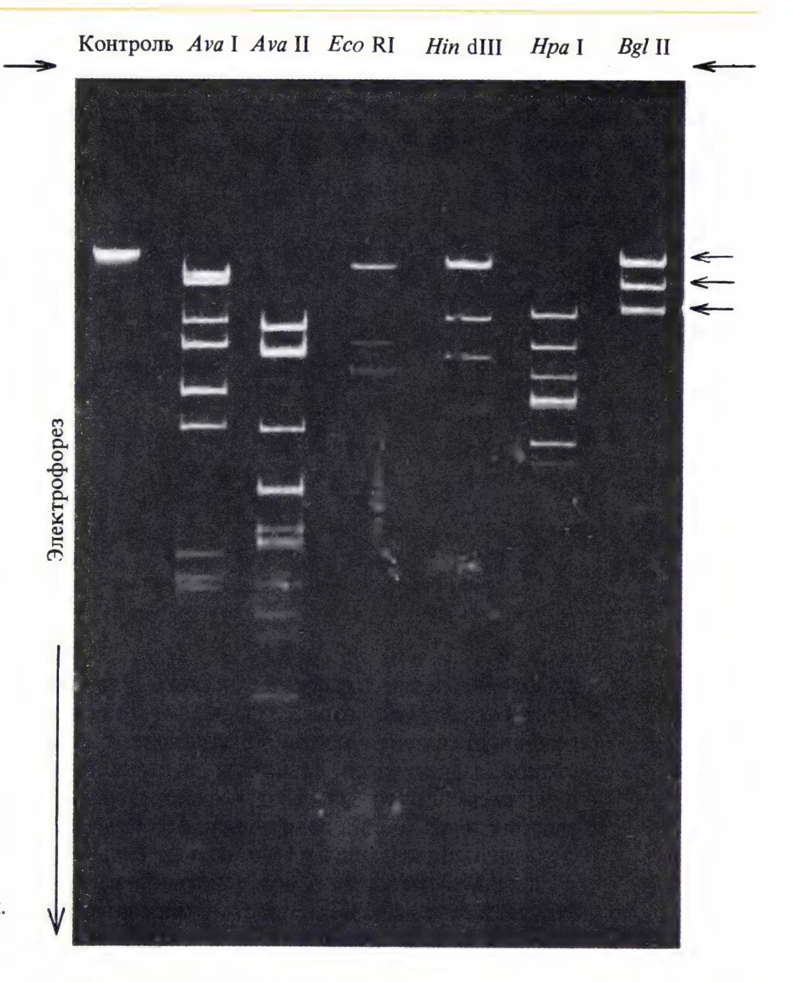


Рис. 9.6. Электрофоретический анализ рестрикционных фрагментов ДНК. ДНК фага λ инкубировали с различными указанными на рисунке рестриктазами время, достаточное для того, чтобы во всех чувствительных сайтах произошло расщепление нуклеотидной последовательности. Образовавшуюся смесь фрагментов ДНК подвергали электрофорезу в агарозном геле. Полосы идентифицировали в ультрафиолетовом свете после окрашивания геля бромистым этидием. Стартовые точки обозначены жирными стрелками. Интактная ДНК фага λ представляет собой линейную молекулу длиной около 48 500 н. п. При действии рестриктазы *Bgl*II возникают фрагменты длиной 22800, 13600, 9800, 2300 н. п. (они отмечены тонкими стрелками) и 460 н. п. (неразличим).

Геном фага φX174 принадлежит к числу самых мелких и наиболее хорошо изученных (см. гл. 7), и именно для этого генома в 1978 году была полностью определена последовательность нуклеотидов с помощью описанного выше подхода (см. гл. 12).

Фаг λ также представляет собой хороший пример того, как можно использовать фрагменты, образующиеся при рестрикции (рестрикты) для описания структуры генома вируса. На рис. 9.6 можно видеть число и размеры фрагментов ДНК, образующихся при действии нескольких различных рестриктаз на геном этого фага. Последовательность фрагментов, образующихся при действии определенной рестриктазы, можно определить с помощью сочетания нескольких методов, цель которых состоит в построении карты сайтов рестрикции генома фага λ. На рис. 9.7 схематически изображена карта сайтов *Eco*RI и *Hin*dIII на фоне генетической и физической карт генома фага λ.

Последовательность образующихся при рестрикции фрагментов в интактной молекуле ДНК можно установить несколькими способами. Прежде всего можно использовать неполное расщепление ДНК эндонуклеазами и последующее разделение фрагментов электрофорезом. Затем

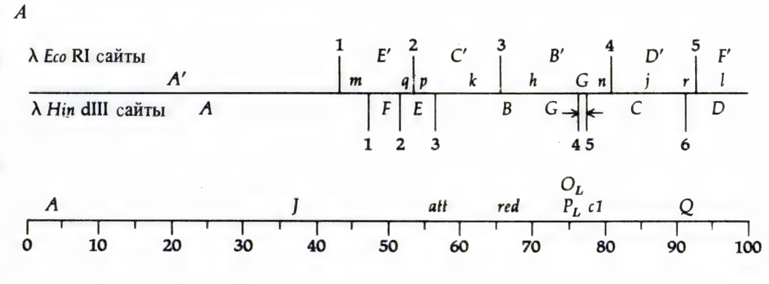




Рис. 9.7. *А*. Физическая карта ДНК фага λ, на которой указаны сайты рестрикции для *Eco* RI и *Hin* dIII. *Б*. Размеры фрагментов, образующихся при действии (1) *Hin* dIII; (2) *Eco* RI и (3) *Hin* dIII и *Eco* RI. [*Murray K., Murray N.* (1975). J. Mol. Biol., **98**, 551.]

выделенные из электрофоретического геля крупные фрагменты снова подвергают действию того же фермента и посредством электрофореза устанавливают идентичность образующихся мелких фрагментов. С другой стороны, фрагменты, возникшие в результате полного расщепления под действием одного фермента, можно извлечь из геля, обработать второй рестриктазой и определить затем с помощью электрофореза размеры образовавшихся мелких фрагментов. Так, например, из рис. 9.7 видно, что выделение фрагмента А под действием рестриктазы *Hin* dIII и последующая обработка *Eco* RI приводят к образованию фрагментов *A′* и *m*, возникающих и при одновременном воздействии обоими ферментами.

Сопоставление карты рестрикции с генетической картой можно осуществить, действуя рестриктазами на ДНК, выделенную из различных мутантов фага λ с известными делециями и перестройками в геноме. Сравнивая фрагменты ДНК фагов дикого типа и мутантных, можно определять участки генетической карты фага λ, в которой локализованы соответствующие фрагменты.

Построение рестрикционной карты генома дает возможность разработать стратегию определения последовательности нуклеотидов в генах, представляющих особый интерес. В результате действия нескольких различных ферментов образуются сравнительно мелкие перекрывающиеся фрагменты, содержащие не более нескольких сотен нуклеотидов. Эти фрагменты могут быть выделены в чистом виде, и в них может быть установлена последовательность нуклеотидов. Затем, зная взаимно перекрывающиеся участки последовательностей, можно восстановить последовательность нуклеотидов в крупных фрагментах и в геноме в целом.

Определение последовательности нуклеотидов в ДНК (секвенирование)

Для определения последовательности нуклеотидов в ДНК было создано несколько методов. Во всех этих методах ферменты рестрикции используются для фиксации специфических «точек отсчета». Последовательность нуклеотидов определяют в одноцепочечных фрагментах, состоящих из 100–200 нуклеотидов. Более длинные последовательности составляются из коротких фрагментов с частично перекрывающимися концами. При секвенировании комплементарной цепи проверяется правильность описания последовательности нуклеотидов в первой цепи.

Все методы определения последовательности нуклеотидов основаны на создании исходного набора одноцепочечных фрагментов ДНК, начинающихся в определенной точке и оканчивающихся определенным нуклеотидом, тогда как размеры фрагментов могут быть различны. Каждый такой исходный набор фрагментов затем фракционируют по размерам посредством электрофореза в геле. Фрагменты должны быть помечены радиоактивным изотопом, для того чтобы их размер можно было определять путем радиоавтографии геля. Принципы секвенирования изображены схематически на рис. 9.8.

Методы секвенирования различаются в первую очередь по способу радиоактивного мечения, и кроме того по способу выделения исходного набора фрагментов. Представленная на рис. 9.8 схема основана на методе, разработанном Максамом и Гилбертом. Рестрикционный фрагмент метят радиоактивным изотопом ^{32}P в 5′-конце с использованием $[\gamma - {}^{32}P]$ АТР и фермента, называемого *полинуклеотидкиназа.* Затем комплементарные цепи разделяют и в них независимо определяют последовательность нуклеотидов. На рис. 9.8 изображена одна цепь; звездочка обозначает радиоактивную метку ^{32}P на 5′-конце. Четыре отдельных образца этого фрагмента подвергают действию различных реагентов, в результате чего образуется четыре исходных набора фрагментов различной величины. Фрагменты каждого из этих наборов на 5′-конце содержат радиоактивную метку, а на другом конце – определенный нуклеотид (см. рис. 9.8). (При этом образуются также наборы фрагментов с одинаковыми 3′-концами, однако, эти фрагменты не попадают в поле зрения исследователя, поскольку не содержат радиоактивной метки). Затем четыре исходных набора фрагментов подвергают электрофорезу в полиакриламидном геле «бок о бок». Положение каждого фрагмента в геле можно зафиксировать на обычной рентгеновской пленке. При этом обнаруживается набор полос, каждая из которых соответствует фрагменту определенного размера. Изображенная на рис. 9.8 последовательность фрагментов позволяет прямо с рентгеновской пленки считывать последовательность нуклеотидов, начиная с 5′-конца (т. е. снизу). На рис. 9.9 представлены реальные результаты радиоавтографии геля после электрофореза фрагментов. Как указывается в подписи к рисунку, в действительности нет необходимости в том, чтобы разрезание фрагментов исходного набора производилось по одному и тому же нуклеотиду.

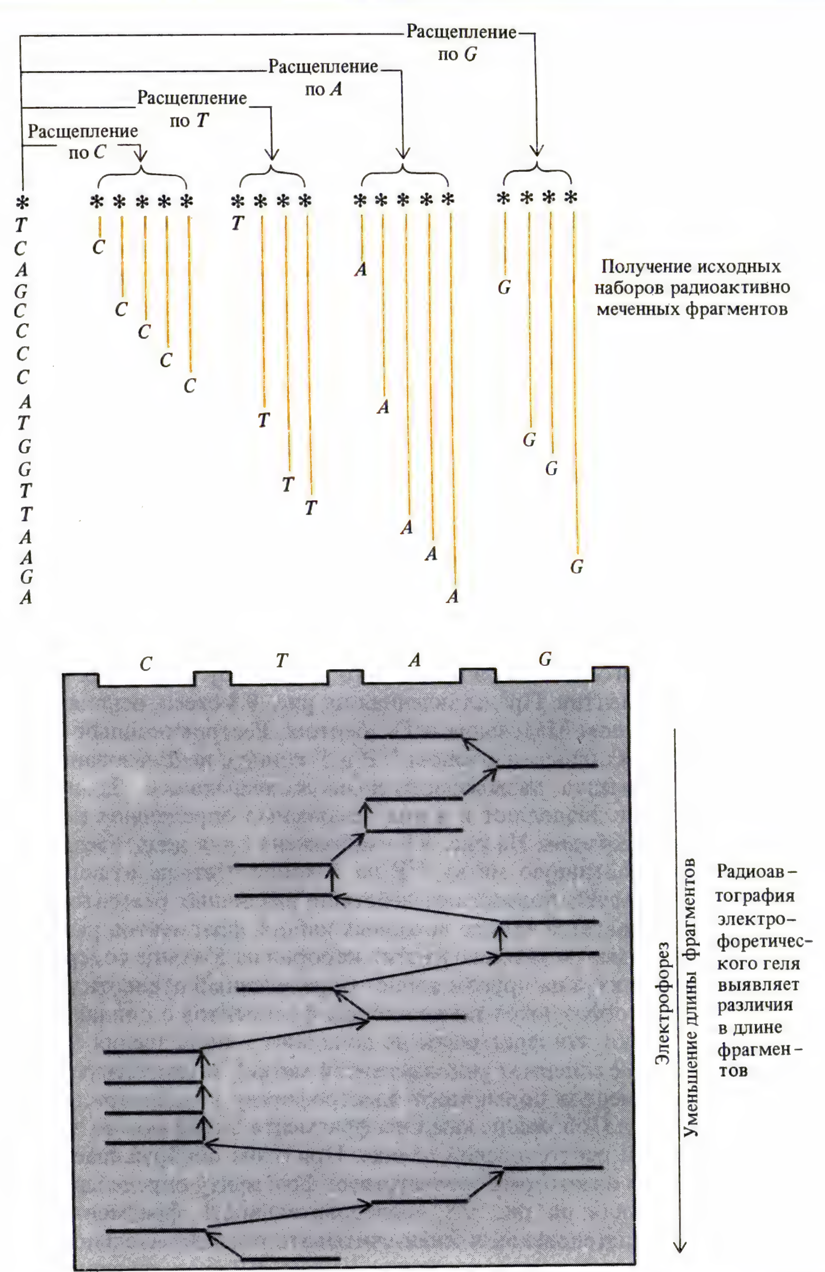


Рис. 9.8. Основные принципы определения нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот. Меченные радиоактивным изотопом (*) фрагменты одноцепочечной ДНК подвергают химической обработке четырьмя различными методами, в результате чего образуются четыре группы фрагментов, в каждой из этих групп фрагменты случайной длины оканчиваются определенным нуклеотидом. Все четыре набора фракционируют затем по размерам посредством электрофореза. Нуклеотидная последовательность при этом может считываться непосредственно с радиоавтографа электрофоретического геля (последовательность стрелок от полосы к полосе на диаграмме).

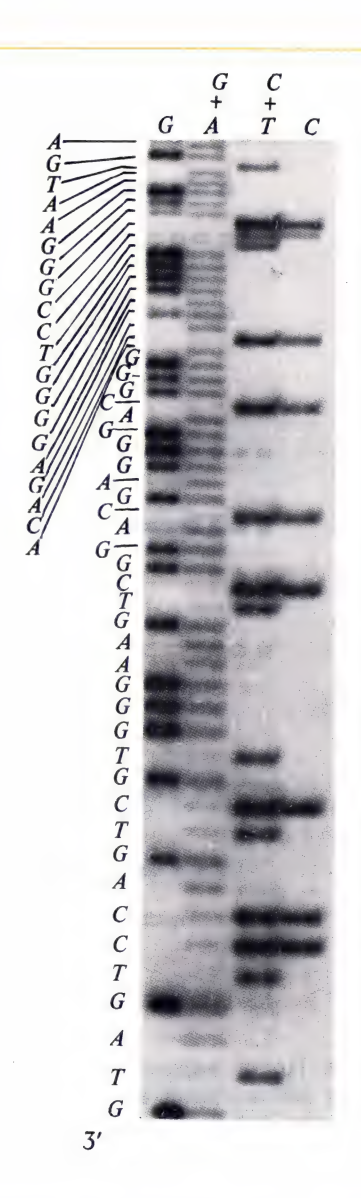


Рис. 9.9. Радиоавтограф электрофоретического геля, по которому считывают нуклеотидную последовательность методом Максама – Гилберта. Изображена последовательность нуклеотидов, заключенная между двумя генами α-глобина ДНК человека. Фрагмент ДНК был помечен на 3′-конце и обработан рестриктазами, расщепляющими по G, C, G и A и C и T (для определения нуклеотидной последовательности нет необходимости в том, чтобы расщепление цепи происходило по единственному основанию). Слева представлена последовательность, которую можно считать с геля.

Метод рекомбинантных ДНК

Ферменты рестрикции позволяют вырезать любые произвольные фрагменты ДНК и комбинировать из них in vitro рекомбинантные (или химерные) молекулы. Это оказывается возможным, поскольку многие рестриктазы разрезают двойную спираль так, что место разреза одной цепи сдвинуто относительно второй, в результате чего образовавшиеся фрагменты обладают комплементарными одноцепочечными концами (см. табл. 9.1). Эти концы могут соединяться посредством образования водородных связей между комплементарными основаниями, причем сшиваться таким образом могут различные фрагменты ДНК, как это показано на

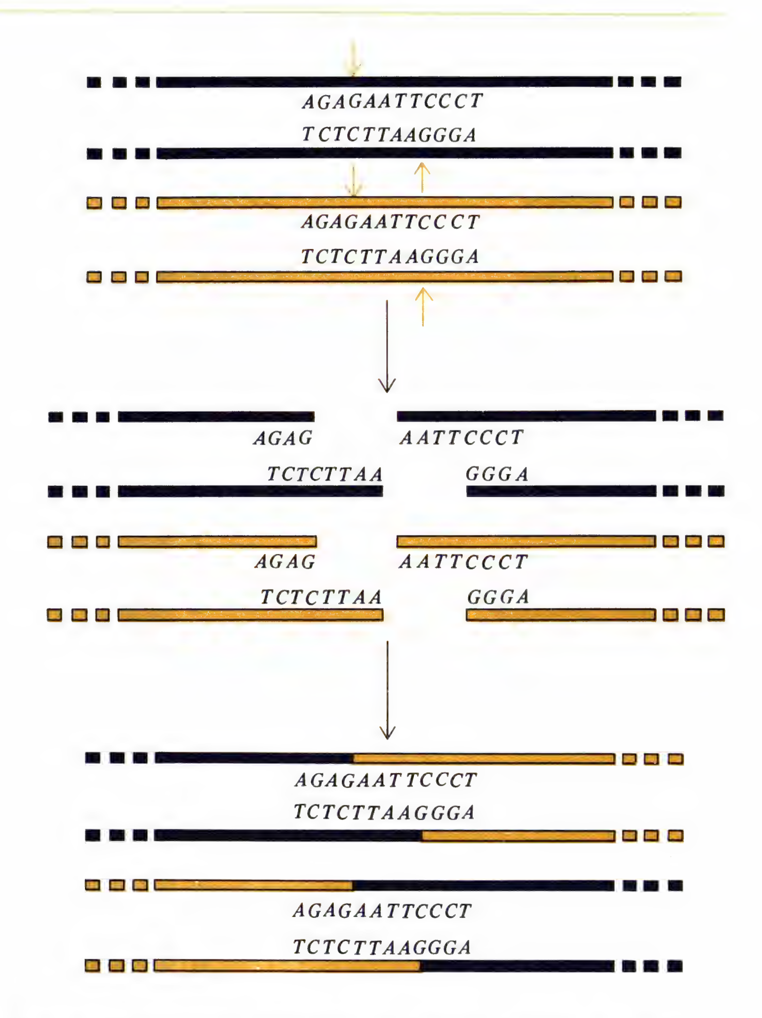


Рис. 9.10. Образование рекомбинантных молекул ДНК. При действии одной рестриктазы на различные молекулы ДНК образуются фрагменты с комплементарными одноцепочечными концами. Соединение таких фрагментов в разных сочетаниях может приводить к образованию рекомбинантных молекул ДНК. Под действием ДНК-лигазы формирование рекомбинантных молекул завершается установлением ковалентных связей.

рис. 9.10. После образования водородных связей между комплементарными основаниями концы фрагментов соединяются ковалентными связями под действием лигазы.

Если один из двух фрагментов ДНК, используемых при конструировании химерной молекулы, представляет собой самостоятельный репликон, например, плазмиду или эписому, то химерная молекула при попадании в бактериальную клетку-хозяина также может обладать способностью к репликации. Репликация такого репликона будет приводить к размножению также второго фрагмента, составляющего рекомбинантную молекулу. Исходный репликон становится при этом вектором для другого фрагмента ДНК.

В качестве таких *векторов для клонирования* (или *клонирующих векторов*) любых фрагментов чужеродной ДНК используются фаг λ и множество различных плазмид. Вектор с клонируемым фрагментом ДНК может проникнуть в клетку *E. coli* после того, как клетка обработана ионами Ca^{++}. Такая процедура позволяет конструировать штаммы бактерий, несущих определенные фрагменты чужеродной ДНК (клоны), и размно-

жать ДНК этих клонов в больших количествах. Совокупность методов, объединяемых названиями «клонирование», или «генная инженерия», произвели революцию в генетике, биохимии и биотехнологии. В настоящее время ДНК эукариотических организмов может изучаться на уровне последовательности нуклеотидов с той же детальностью, которая еще недавно была возможна лишь в отношении ДНК вирусов. Методы генной инженерии позволяют использовать *E. coli* в качестве фабрик для производства продуктов функционирования генов человека, например, для производства инсулина и гормона роста. Вероятно, в недалеком будущем это даст возможность успешно и недорого лечить диабет, возникающий при недостатке инсулина в организме, и карликовость, являющуюся следствием недостатка гормона роста. Методы рекомбинантных ДНК открывают широкие перспективы в решении проблем медицины, сельского хозяйства и химической технологии. Эти методы обещают возникновение новой индустрии, называемой биотехнологией, привлекающей в настоящее время внимание средств массовой информации и финансирующих организаций.

Векторы для клонирования ДНК

Методы клонирования чужеродной ДНК в клетках *E. coli* удобно проиллюстрировать на примере плазмиды pBR322, специально сконструированной Франциско Болваром и Раймондом Родригесом для клонирования маленьких фрагментов ДНК, состоящих всего из нескольких тысяч пар оснований или еще меньше. Эта плазмида невелика (4362 нуклеотидные пары), несет гены антибиотикоустойчивости *amp* и *tet* и в каждой бактериальной клетке может присутствовать во множестве копий. Последовательность нуклеотидов плазмиды известна. Ее физическая карта представлена на рис. 9.11. Обратите внимание на то, что имеется один сайт для рестриктазы *Pst* I в гене *amp* и по одному сайту для рестриктаз *Bam* HI и *Sal* I в гене *tet*. Наличие этих сайтов именно

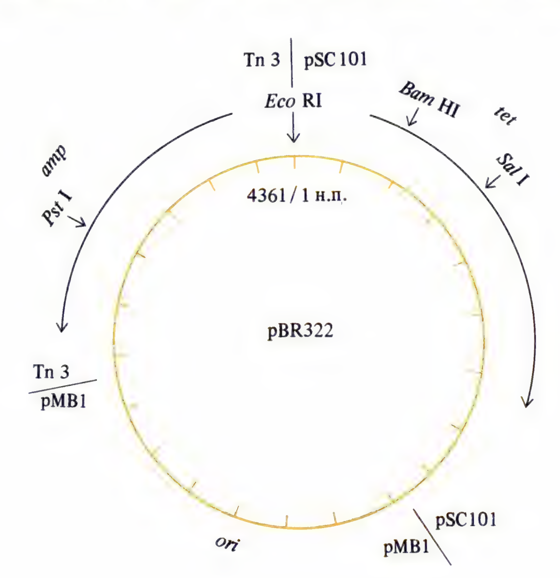


Рис. 9.11. Физическая карта клонирующей плазмиды pBR322. Эта плазмида сконструирована из трех частей. Участок начала репликации (*ori*) – из плазмиды pMB1; ген *tet* – из плазмиды pSC101, а ген *amp* – из транспозона Tn3. Указаны соответствующие уникальные сайты рестрикции.

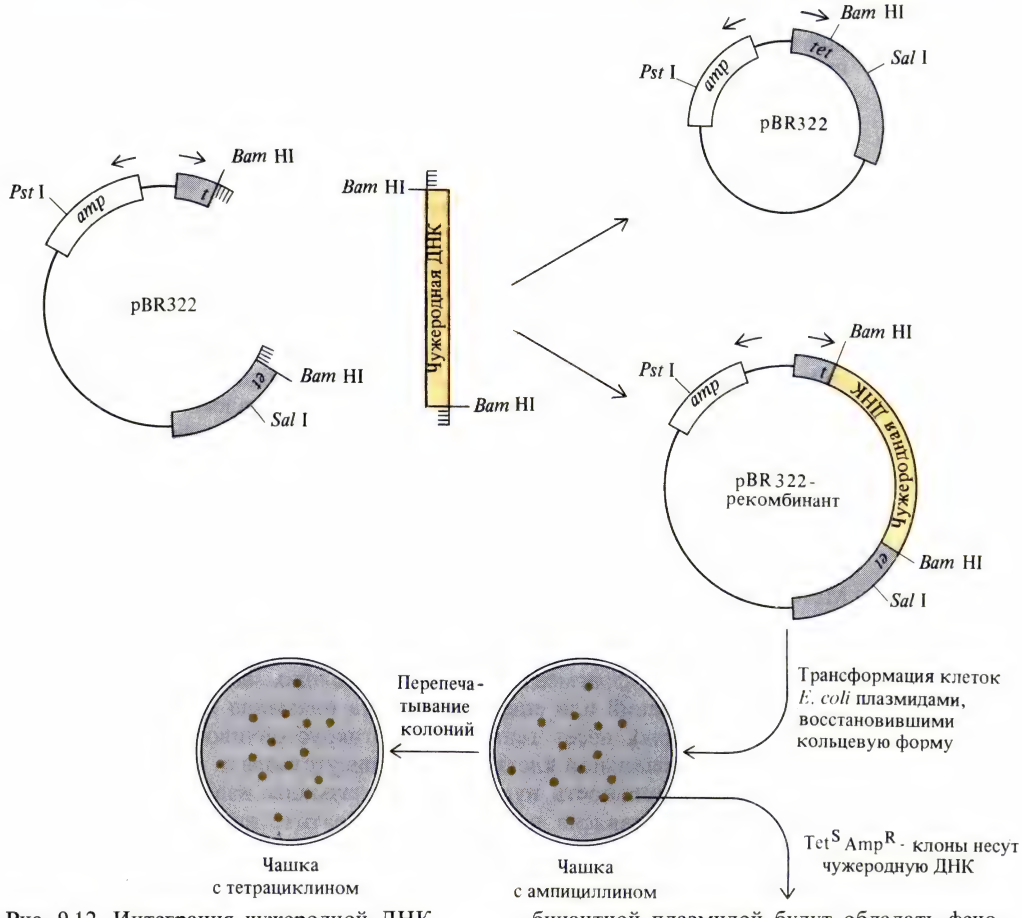


Рис. 9.12. Интеграция чужеродной ДНК в плазмиду pBR322 и отбор клона-носителя ДНК. Вставка чужеродной ДНК в сайт *Bam* HI локализованный внутри гена *tet*, инактивирует этот ген. Клетки с рекомбинантной плазмидой будут обладать фенотипом $Tet^S Amp^R$, а клетки с плазмидой pBR322, восстановившей свою прежнюю структуру – фенотипом $Tet^R Amp^R$.

в генах устойчивости к двум антибиотикам дает возможность отбирать плазмиды, несущие чужеродную ДНК (рис. 9.12).

Плазмиду рестрицируют *Bam* HI и образовавшиеся линейные молекулы смешивают с фрагментами чужеродной ДНК, полученными также под действием этой рестриктазы. Одноцепочечные комплементарные концы этих молекул могут соединиться различными способами, прежде чем под действием лигазы возникнут ковалентные связи. Во-первых, концы линейной молекулы ДНК плазмиды могут соединиться друг с другом: при этом восстановится исходная кольцевая плазмида с интактным геном *tet*. Возможно, однако (именно это и требуется), что перед превращением линейной молекулы ДНК плазмиды в кольцевую, между ее концами встроится фрагмент чужеродной ДНК; при этом целостность гена *tet* нарушится. Полученной in vitro смесью молекул ДНК трансформируют клетки *E. coli*, предварительно обработанные ио-

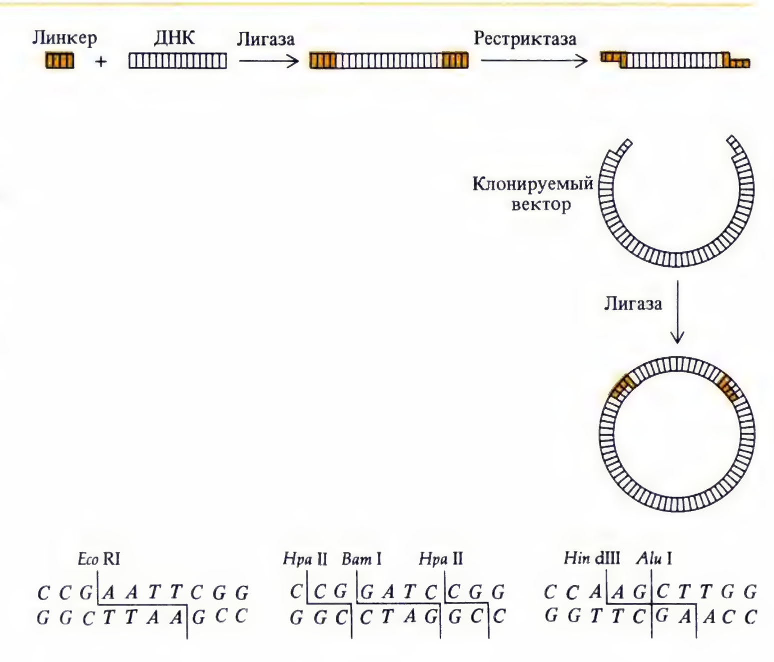


Рис. 9.13. Синтетические фрагменты ДНК, содержащие сайты рестрикции, можно использовать в качестве связующих звеньев (линкеров) при создании рекомбинантных молекул. *А*. Любой фрагмент ДНК без липких концов можно клонировать при использовании двухцепочечных линкеров. *Б*. Структура трех линкеров.

нами Ca^{++} с тем, чтобы сделать эти клетки проницаемыми для ДНК. Затем трансформированные бактерии высевают на среду, содержащую ампициллин. На таком агаре размножаются лишь те клетки, которые обладают фенотипом Amp^R и, следовательно, содержат восстановленную плазмиду или плазмиду с встроенным фрагментом чужеродной ДНК. Колонии, выросшие на среде с ампициллином, перепечатывают на чашки с тетрациклином. Клетки с восстановленной кольцевой плазмидой, содержащей неповрежденный ген *tet*, будут иметь фенотип Tet^R, тогда как клетки, в плазмиду которых встроен фрагмент чужеродной ДНК, окажутся чувствительными к тетрациклину (Tet^S). Клоны с фенотипом $Tet^S Amp^R$ можно отобрать для дальнейшего исследования встроенных фрагментов ДНК.

Процедуру клонирования можно вести с помощью рестриктазы *Sal*I, а не *Bam*HI, и точно так же отбирать колонии трансформантов с фенотипом $Tet^S Amp^R$; при этом будут клонироваться фрагменты чужеродной ДНК, специфичные именно для *Sal*I и отличные от фрагментов, клонируемых *Bam*HI. Можно также в качестве рестрицирующего фермента при клонировании с помощью вектора pBR322 использовать *Pst*I; при этом для дальнейших исследований природы встроенных фрагментов следует отбирать колонии с фенотипом $Tet^R Amp^S$.

Химический синтез палиндромных двухцепочечных олигонуклеотидов, получивших наименование «*линкеры*» (связывающие звенья) дает возможность клонировать любые фрагменты чужеродной ДНК безотносительно к специфичности сайтов рестрикции. Эти короткие «тупоконечные» (т. е. не обладающие одноцепочечными концами) молекулы двухцепочечной ДНК могут ДНК-лигазой фага Т4 ковалентно соединяться с произвольными тупоконечными фрагментами ДНК, которые мы хотим клонировать (рис. 9.13). Эти фрагменты могут «выстригать-

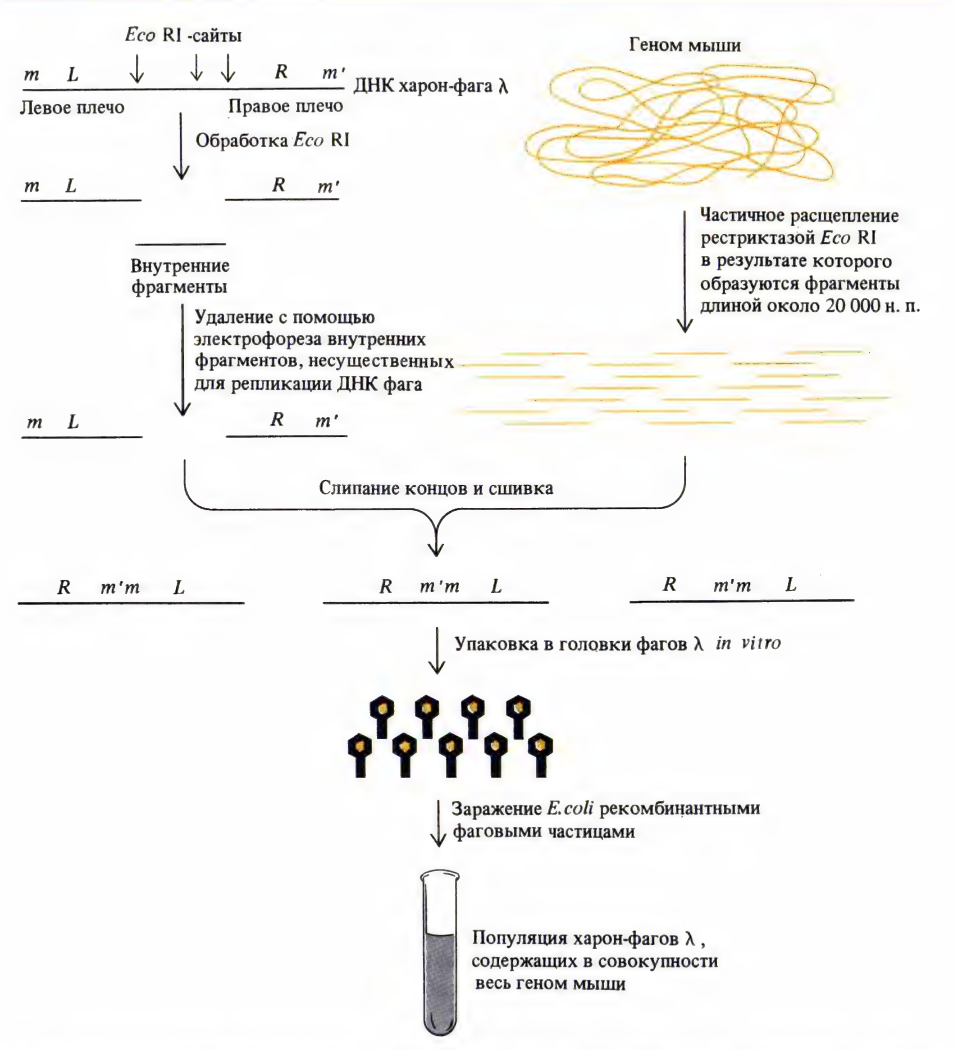


Рис. 9.14. Использование харон-фага λ для клонирования крупных фрагментов ДНК мыши. Эффективное клонирование оказывается возможным благодаря действующей in vitro системе упаковки, полученной из инфицированных фагом λ клеток *E. coli*. Эта система содержит все структурные белки и ферменты, необходимые для того, чтобы инфицирующие частицы фага были носителями векторной ДНК, в том числе ферменты, разрезающие длинные контамерные молекулы ДНК.

ся» из любых молекул ДНК физическими методами; границы фрагментов при этом не зависят от распределения сайтов рестрикции.

Геном бактериофага λ был превращен генными инженерами в наиболее удобный вектор для клонирования крупных фрагментов чужеродной ДНК. В геноме фага λ есть два участка, не содержащие генов, необходимых для литического развития и производства потомства. Эти участки включают, соответственно, 22 000 нуклеотидных пар в середине карты и 3000 между генами *P* и *Q* (см. рис. 7.7). Таким образом, около

25 000 пар нуклеотидов ДНК фага λ можно заменить чужеродной ДНК, не затрагивая способности этого фага выступать в роли вектора. Нормальный геном фага λ содержит 49 000 нуклеотидных пар, однако головка фага может вместить от 38 000 до 53 000 н. п., продолжая при этом функционировать нормально. Можно сконструировать множество различных линий фага λ, предназначенных для клонирования разнообразных фрагментов чужеродной ДНК, подчиняющихся лишь сформулированным выше ограничениям. Примерами таких векторов могут служить так называемые харон-фаги λ (по имени мифического перевозчика в царство мертвых) и λgt-фаги (осуществляющие общую трансдукцию). Они сконструированы таким образом, что гены, ответственные за жизненно важные функции, локализованы на левом и правом концах генома, а середина существенных генов не несет и кроме того ограничена двумя различными сайтами рестрикции. Эта центральная часть генома содержит гены, влияющие на морфологию колоний, так что по их форме можно сразу определить, чужеродная или собственная ДНК включена в головку. Использование харон-фагов λ при клонировании фрагментов чужеродной ДНК схематически изображено на рис. 9.14.

Библиотеки геномов

Одна из основных целей клонирования различных фрагментов ДНК прокариотических и эукариотических организмов состоит в расчленении геномов на участки, достаточно малые для того, чтобы было возможно их детальное исследование. Интуитивно представляется очевидным, что, если накопить достаточно большое количество клонируемых фрагментов ДНК, эта коллекция будет включать по меньшей мере по одному экземпляру каждой последовательности генома. Такую коллекцию клонируемых фрагментов называют библиотекой генома или банком генов.

Если клонируют фрагменты генома *Drosophila melanogaster* средней длины $15–20 \cdot 10^3$ н. п., то для того, чтобы в коллекции были представлены все участки генома, достаточно около 40 000 независимых клонов (общая длина генома составляет около $1,5 \cdot 10^8$ н. п.). Для полной библиотеки генома человека требуется около 800 000 клонов (см. дополнение 9.2). В библиотеке генов содержится вся наследственная информация организма. Однако определение того, какой именно из томов библиотеки (т. е. клонов) содержит необходимую в каждом конкретном случае информацию, представляет очень сложную для генетиков проблему. Если копия соответствующей генетической информации оказывается доступной в форме структуры молекулы РНК или в форме последовательности аминокислот, то это может быть использовано при отыскивании в библиотеке клона, содержащего требуемую информацию.

Такой поиск осуществляют следующим образом. Библиотеку фагов λ высевают на большую чашку Петри, так чтобы на чашке было приблизительно 10 000 негативных колоний. Например, библиотека генома *Drosophila melanogaster* умещается всего на четырех таких чашках. Каждая негативная колония содержит химерные инфекционные фаги и большое количество химерных молекул фаговой ДНК, не уместившихся в головки фагов. Эта свободная ДНК дает возможность определить, какие именно из негативных колоний содержат интересующие нас

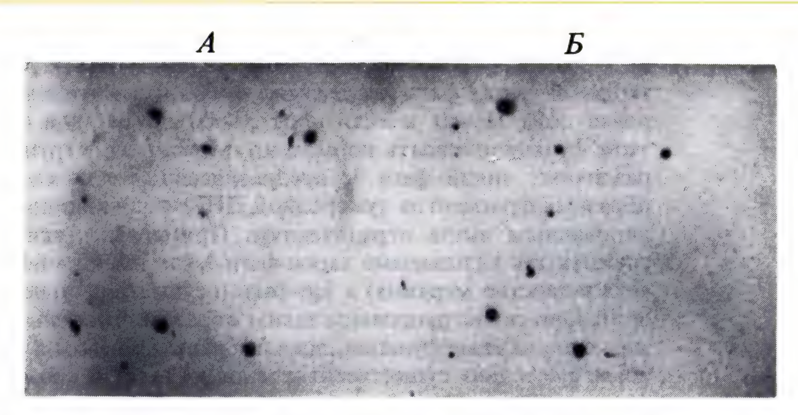


Рис. 9.15. Поиск в библиотеке генома тутового шелкопряда генов оболочки яйца. На рисунках (*А*) и (*Б*) представлены две пленки, снятые с одной и той же чашки Петри, содержащей 5000 негативных колоний. Обе пленки выдерживали некоторое время с меченной P^{32} кДНК, полученной с помощью обратной транскрипции из мРНК, выделенной из развивающихся ооцитов. Затем с пленок смывали остаток не вступившего в гибридизацию зонда, и подвергали радиоавтографии. Черные пятнышки соответствуют негативным колониям, в которые включился радиоактивный зонд. Сравнение пятнышек на двух экземплярах пленки позволяет отличить случайные «позитивы», проявившиеся лишь на одной из двух пленок, от истинных, проявившихся на обеих.

фрагменты ДНК. К поверхности чашки Петри прикладывают специальную пленку, на которой отпечатываются все негативные колонии. Затем пленку снимают и помещают в раствор щелочи, денатурирующий ДНК. Пленку высушивают и выдерживают в вакууме при температуре 80°С, что приводит к установлению ковалентных связей между отпечатанными одноцепочечными молекулами ДНК и пленкой.

На следующем этапе работы эту пленку помещают в раствор, содержащий так называемый *зонд*, т.е. одноцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты, комплементарные отыскиваемым в библиотеке и содержащие радиоактивную метку. Таким радиоактивным зондом может служить информационная РНК, выделенная из ткани, в которой наиболее активно функционирует интересующий нас ген; это может быть также искусственный дезоксиолигонуклеотид, синтезированный так, чтобы отвечать известной последовательности аминокислот в том белке, который кодируется разыскиваемым нами геном; наконец, это может быть рестрикт из другого участка клонируемой ДНК. Радиоактивный зонд гибридизирует с комплементарной ДНК на поверхности пленки. Затем с пленки смывают не вступившие в гибридизацию остатки зонда и производят радиавтографию, позволяющую установить, где именно на поверхности пленки, а значит и на поверхности чашки Петри, располагаются негативные колонии, содержащие ДНК, способную гибридизировать с зондом (рис. 9.15). Затем из соответствующих негативных колоний можно выделить фаг, содержащий интересующий нас фрагмент чужеродной ДНК.

Труднее выделить из библиотеки клоны, соответствующие генам с известным фенотипическим проявлением, но неизвестным непосред-

ственно биохимическим продуктом функционирования. Метод, с помощью которого эту задачу можно решить, был впервые предложен применительно к геному дрозофилы Бендером и Хогнессом и получил название «прогулки по хромосоме». Этот метод требует, чтобы, во-первых, была заранее известна локализация интересующего нас гена на генетической карте политенной хромосомы (см. главу 5, например, рис. 5.19) и, во-вторых, чтобы для какого-нибудь гена той же хромосомы существовал зонд.

Рассмотрим в качестве примера участок X-хромосомы, изображенный на рис. 5.19, и будем двигаться по хромосоме, как это изображено на рис. 9.16. Наша цель состоит в том, чтобы отыскать в библиотеке клонируемые фрагменты ДНК, отвечающие гену *dunce*, локализованному в хромомере 3D4. Этот ген необходим для формирования нормальной памяти у мух; при этом он также кодирует фермент cAMP-специфическую фосфодиэстеразу. Прогулка по хромосоме начинается с рекомбинантного клона λcDm1570, несущего ДНК из хромомера 3С11-12. Этот химерный фаг извлекается из библиотеки генов дрозофилы посредством гибридизации с информационной РНК, выделенной из слюнных желез личинок. Эта информационная РНК кодирует клейкий белок, обозначаемый символом *Sgs-4*. Генетическое картирование мутаций, затрагивающих *Sgs-4*, позволяет локализовать этот ген в полосе 3011-12 политенной хромосомы (рис. 9.16). Клонированная ДНК *Sgs-4* гибридизирует с ДНК из полосы 3С11-12 политенной хромосомы, расположенной непосредственно справа от левого края делеции $Df(1)dm^{75e19}$. Это можно показать, используя разработанный Эдвином Саузерном метод перенесения электрофоретических фрагментов ДНК на специальную пленку, связывающую одноцепочечные молекулы ДНК (блотинг по Саузерну; см. рис. 9.6). Затем на эту пленку наносят радиоактивный зонд, что позволяет определить, какие из фрагментов ДНК в геле комплементарны последовательности нуклеотидов зонда. Этот метод схематически изображен на рис. 9.17.

Используя метод Саузерна при сравнении нормальных мух и мух, в геноме которых имеются делеции, можно локализовать концы этих делеций, если использовать в качестве зонда клонируемую ДНК. О нарушении нормальной нуклеотидной последовательности в делетированной хромосоме свидетельствует изменение распределения сайтов рестрикции по сравнению с ДНК нормальной хромосомы. Например, если конец делеции находится между двумя сайтами рестрикции нормальной ДНК, то расстояние между оставшимся сайтом и следующим (внутри делеции) изменится, поскольку почти наверняка следующий сайт в делеции окажется на другом расстоянии от сохранившегося, чем был первый. На рис. 9.18 показано использование метода Саузерна для определения нового распределения сайтов рестрикции.

На рис. 9.18, *А* представлены результаты опыта, в котором ДНК мух дикого типа (Oregon-R) и $Df(1)dm^{75e19}/Df(1)N^{64j15}$ подвергали действию *Hin*dIII, а затем сравнивали методом Саузерна, используя в качестве радиоактивного зонда ДНК дрозофилы из клона λcDm2151. Обратите внимание на то, что распределение сайтов рестрикции в обеих ДНК одинаково, так как ДНК дрозофилы из λcDm2151 комплементарна последовательности и нормальной ДНК, и ДНК из хромосомы с делецией $Df(1)dm^{75e19}$. (Обратите также внимание на то, что, как это видно на рис. 9.16, в хромосоме с делецией $Df(1)N^{64j15}$ отсутствует

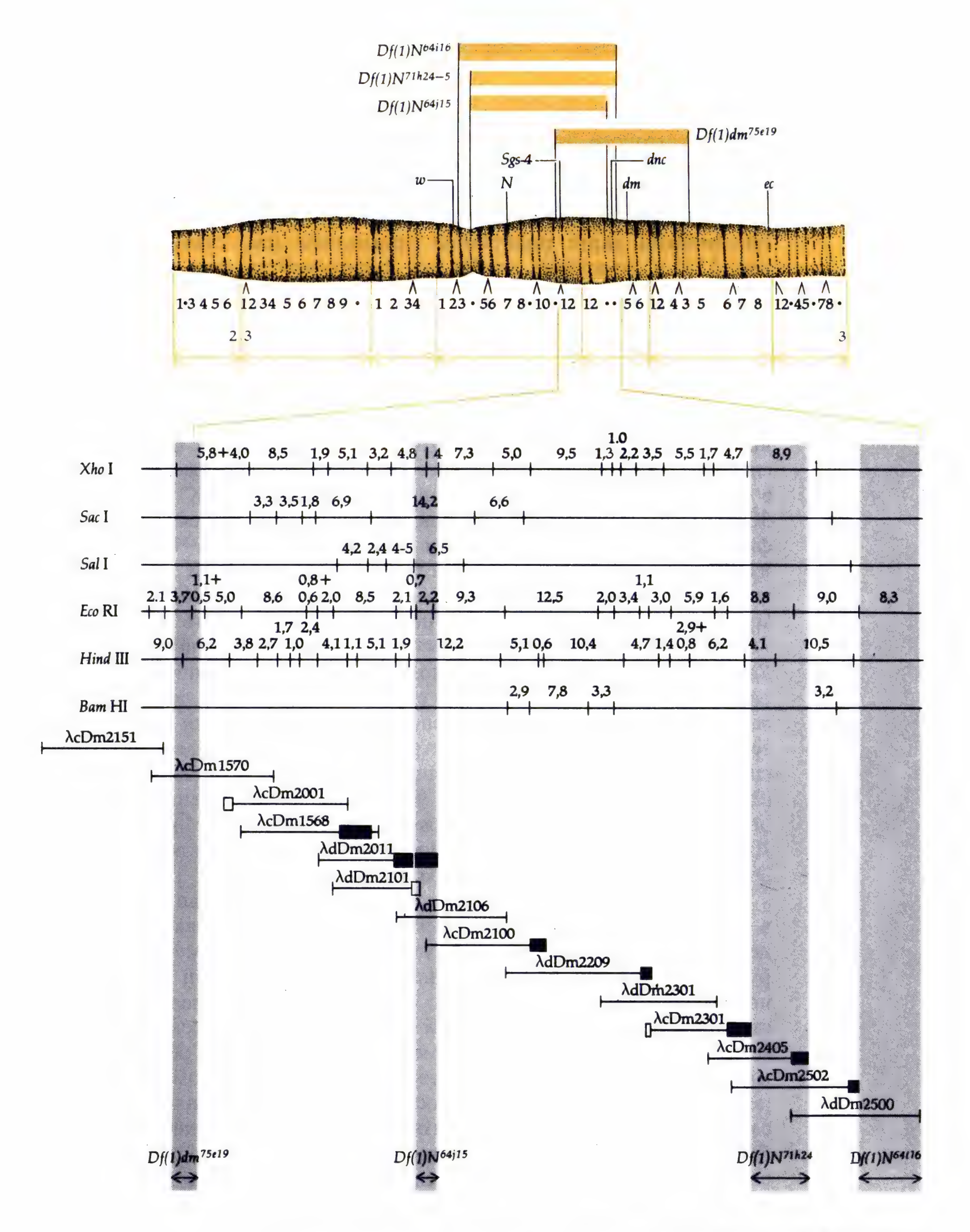


Рис. 9.16. Карта рестрикции участка Х-хромосомы *Drosophila melanogaster*, полученная при анализе перекрывающихся фрагментов ДНК клонированных в харон-фагах λ и отобранных методом «прогулки по хромосоме» слева направо, как это описано в тексте. На рисунке представлена карта участка протяженностью около 100 000 н. п. Серыми полосами изображены концевые точки некоторых из хромосомных перестроек; ширина полос соответствует точности, с которой локализованы концевые точки перестроек на рестрикционной карте.

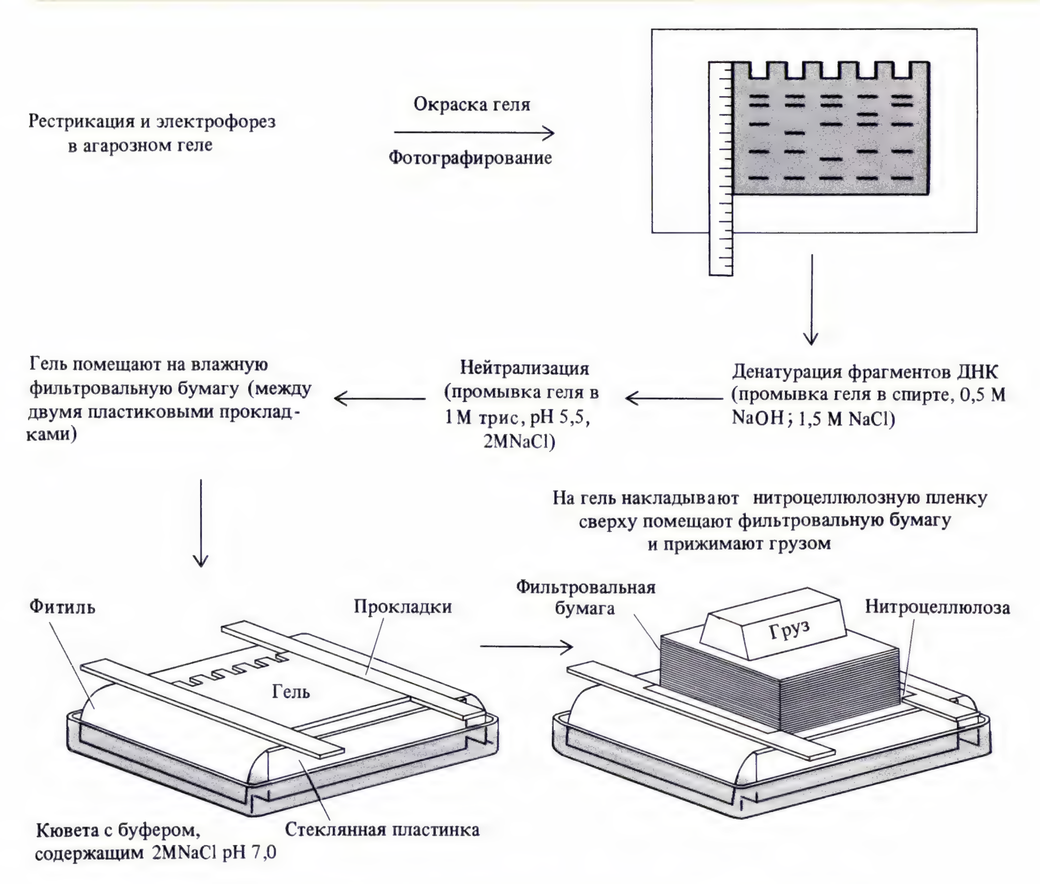


Рис. 9.17. Метод Саузерна. Молекулы ДНК обрабатывают рестриктазами и образовавшиеся фрагменты подвергают электрофорезу в агарозном геле. Размеры рестрикционных фрагментов определяют по фотографиям геля, окрашенного бромистым этидием. Затем фрагменты денатурируют и переносят на пленку из нитроцеллюлозы с помощью фильтровальной бумаги. Фрагменты ДНК ковалентно связываются с пленкой, после чего пленку обрабатывают радиоактивным зондом и подвергают радиоавтографии. Сравнение радиоавтографа с фотографией окрашенного после электрофореза геля позволяет определить рестрикты, комплементарные радиоактивному зонду. [*Rodriguez R. L., Tait R. C.*, University of California, Davis.]

участок ДНК вокруг полосы 3С11–12, так что анализируется лишь ДНК из хромосомы $Df(1)dm^{75e19}$.) Сравним теперь те же фрагменты, используя в качестве радиоактивного зонда ДНК дрозофилы клона λcDm1570, который имеет общий участок с ДНК клона λcDm2151 (рис. 9.16). Распределение сайтов рестрикции при этом (рис. 9.18, *Б*) получается совершенно иным. Фрагменты, образующиеся при рестрикции нормальной ДНК, теперь отсутствуют, и имеется лишь один фрагмент другого размера в ДНК хромосомы $Df(1)dm^{75e19}$. Внимательное рассмотрение

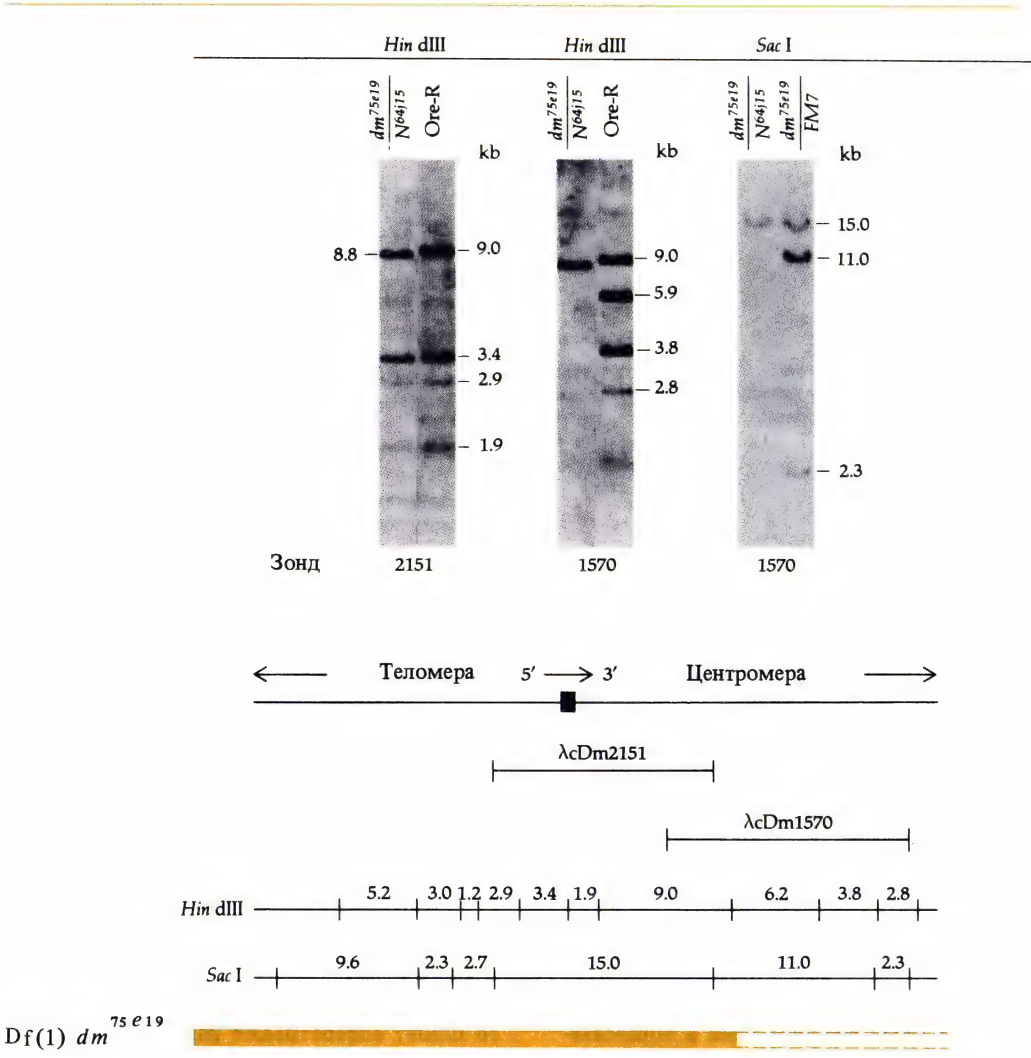


Рис. 9.18. Локализация концов хромосомных перестроек на карте сайтов рестрикции ДНК. ДНК мух с генотипом $Df(1)dm^{75e19}/Df(1)N^{64j15}$ сравнивают с ДНК мух дикого типа линии Oregon-R. Сравнение проводят по методу Саузерна. Фрагменты рестрикции идентифицируют с помощью гибридизации радиоактивной ДНК харон-фагов λcDm2151 и λcDm1570. В хромосоме $Df(1)N^{64j15}$ полностью отсутствует ДНК из участка, содержащего ген *Sgs*-4 и, следовательно, все присутствующие в геноме фрагменты ДНК принадлежат хромосоме $Df(1)dm^{75e19}$.

карты рестрикции, изображенной на рис. 9.18, *В*, показывает, что новый фрагмент, длиной примерно в 8,8 т. п. н., должен представлять собой левую часть фрагмента длиной 9,0 т. п. н., идентифицируемого зондом λcDm1570. Следовательно, крайняя точка делеции $Df(1)dm^{75e19}$ должна располагаться внутри фрагмента λcDm1570, причем неподалеку от правого конца участка длиной 9,0 т. п. н. фрагмента *Hin*dIII. После того как установлено, что λ-вектор, несущий участок ДНК из хромо-

Дополнение 9.2. Сколь велика библиотека генома?

Число независимо клонируемых случайно выбранных фрагментов ДНК, необходимое для того, чтобы составить библиотеку генома (иногда говорят «банк генов»), зависит от размера генома организма и от величины клонируемых фрагментов ДНК.

Пусть N – число независимых клонов, составляющих библиотеку;

P – вероятность того, что данная нуклеотидная последовательность представлена в библиотеке;

L – средняя величина клонируемых фрагментов ДНК;

X – размер данной искомой нуклеотидной последовательности;

M – размер генома.

Тогда

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln\left(1 - \dfrac{L-X}{M}\right)}.$$

Это выражение[1] позволяет определить вероятность того, что в коллекции из N клонов представлен ген величины X. Обычно в качестве минимально приемлемого значения вероятности выбирается $P = 0{,}99$ и разрабатывается состав реакционной смеси, гарантирующей получение числа независимых рекомбинантных векторов, превышающих данное N.

[1] *Clarke L., Carbon J.* (1976). Cell, **9**, 91–99.

сомы дрозофилы, включает конец делеции $Df(1)dm^{75e19}$, можно начать «прогулку по хромосоме».

Делая первый шаг по хромосоме, мы используем радиоактивно меченный рестрикционный фрагмент ДНК дрозофилы в λcDm1570 в качестве зонда, позволяющего отобрать в библиотеке генов дрозофилы другие фаги, гибридизирующие с ним. При этом оказывается, что существует общий участок у векторов λcDm1570 и λcDm2001 (рис. 9.16). Следующий шаг состоит в том, чтобы используя в качестве зонда радиоактивно меченный фрагмент рестрикции вектора λcDm2001, расположенный правее участка, общего с вектором λcDm1570, выбрать из библиотеки новые фаги, гибридизирующие с λcDm2001. Таким способом из библиотеки последовательностей отбирается набор фрагментов с общими участками; полученная таким образом коллекция рекомбинантных фагов дает расшифровку последовательности вправо от гена *Sgs-4* (рис. 9.16). Из карт сайтов рестрикции отдельно взятых клонируемых сегментов можно собрать карту участка хромосомы в целом. Для того чтобы в процессе такой «прогулки по хромосоме» следить, в какой именно точке мы находимся, следует использовать клонируемые зонды для локализации на карте рестрикции концевых точек других хромосомных перестроек (рис. 9.18). В результате такой процесс прогулки по хромосоме может быть спроецирован на цитологическую карту, поскольку известны клоны, захватывающие концевые точки делеций $Df(1)N^{64j15}$, $Df(1)N^{75h24}$ и $Df(1)N^{64i16}$.

Обзор методов работы с ДНК

«Прогулка по хромосоме» – это инструмент, позволяющий систематически картировать хромосомы эукариотических организмов. Обсуждавшиеся в этой главе методы работы с ДНК – клонирование рестрикционных фрагментов, анализ сайтов рестрикции в клонируемой ДНК, метод Саузерна, использование клонируемой ДНК в качестве радиоактивного зонда при гибридизации с другими фрагментами ДНК – дают возможность использовать мощные методы генетического анализа, разработанные на прокариотических организмах, для исследования генетической организации эукариот на уровне нуклеотидных последовательностей. Применение этих методов привело к колоссальному прогрессу в наших знаниях об организации, функционировании и эволюции геномов эукариот. Некоторые из этих открытий мы подробно обсудим в следующих главах, о других можно прочитать в научных журналах.

Не удивительно, что новые эффективные методы исследований нашли применение не только в фундаментальных исследованиях. Они оказывают глубокое влияние на медицину, ветеринарию, селекцию животных, растений, на микробиологическую промышленность. Приведем всего лишь несколько примеров.

Рестрикционный анализ ДНК позволяет выявить различия в отдельных нуклеотидных парах, появляющиеся в результате мутаций в сайтах, узнаваемых соответствующим ферментом. В случае серповидноклеточной анемии происходит замена AT на TA в шестой паре нуклеотидов гена, кодирующего β-цепь гемоглобина человека; замена происходит в сайте (CTNAG), чувствительном к рестриктазе *Dde*I (рис. 9.19). Фрагменты ДНК, возникающие под действием *Dde*I у здорового человека и больного серповидноклеточной анемией можно сравнить с помощью метода гибридизации по Саузерну, используя в качестве зонда радиоактивно меченную ДНК гена β-глобина, как это показано на рис. 9.19. Таким способом можно определять присутствие вредного мутантного гена в геноме эмбриона за несколько месяцев до рождения. Для этого культивируют зародышевые клетки, взятые при амниоцентезе. ДНК этих клеток экстрагируют и подвергают анализу. Такая диагностическая процедура может производиться в тех случаях, когда существует подозрение, что оба родителя – носители вредного рецессивного гена. Следует заметить, что в большинстве случаев вредные мутации происходят вне сайтов, узнаваемых рестриктазами. Однако иногда такие мутации оказываются в хромосомах тесно сцепленными с сайтами рестрикции, что может во многих случаях использоваться в пренатальной диагностике.

Новые методы работы с ДНК позволяют также значительно усовершенствовать методы создания вакцин против различных вирусных заболеваний человека и животных. Такие новые способы, включая клонирование и определение нуклеотидной последовательности ДНК вируса, применяли при разработке вакцин против ящура – одной из наиболее распространенных в мире тяжелых болезней свиней и крупного рогатого скота. Современные вакцины, приготовленные традиционным способом, используют «инактивированные» или ослабленные препараты, которые, однако, иногда содержат патогенные вирусы, что может приводить к вспышкам болезни. Кроме того, некоторые штаммы вирусов при культивировании в лабораторных условиях не достигают кон-

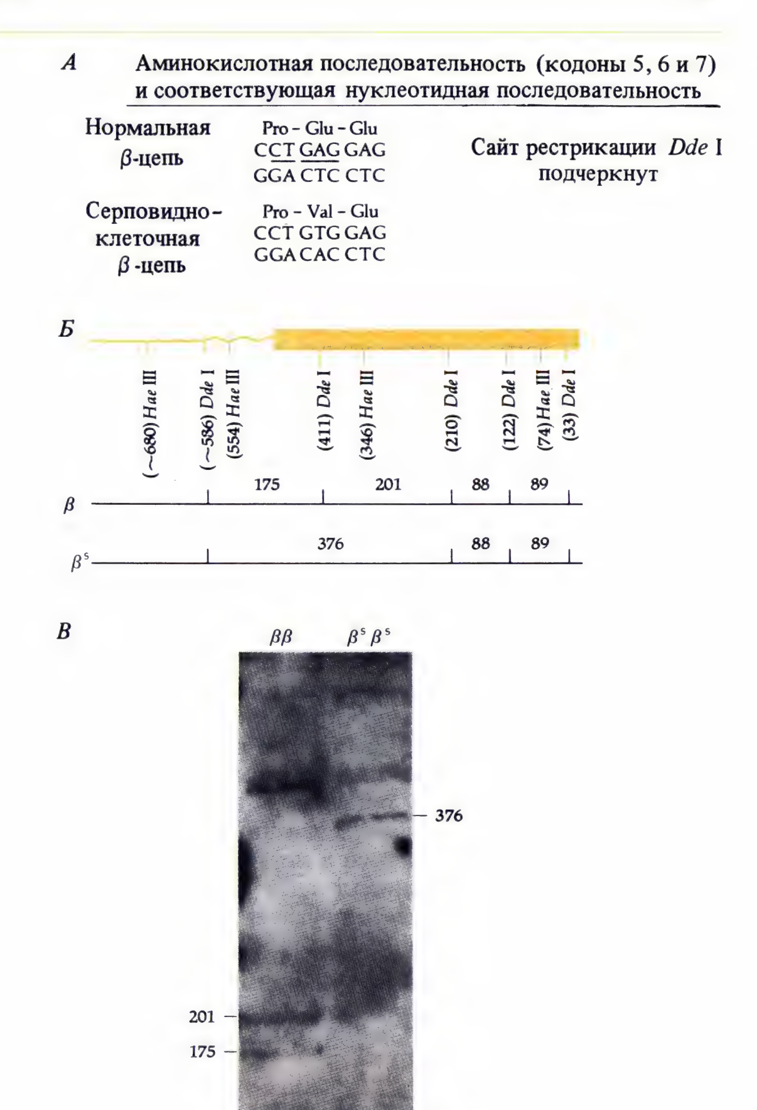


Рис. 9.19. Исследование мутации серповидноклеточной анемии на уровне ДНК. *А*. Нормальная и мутантная последовательности аминокислот и соответствующие им последовательности нуклеотидов в ДНК. *Б*. Карта сайтов рестрикции клонируемого зонда для участка гена β-цепи гемоглобина человека. Широкой полосой изображен транскрибируемый участок ДНК, тонкой линией – нетранскрибируемый участок на 5'-конце гена. В нижней части рисунка показана локализация *Dde* I-сайтов на рестрикционной карте нормальной и мутантной форм. *В*. Размеры *Dde* I-рестриктов ДНК из нормальных клеток (ββ) и клеток, гомозиготных по мутации серповидноклеточной анемии ($\beta^s\beta^s$), определяли с помощью радиоактивного зонда. [*Geever R.F.* et al. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **8**, 5081.]

центраций, достаточно высоких для вакцинации. Разработка синтетических вакцин позволяет решить многие из этих проблем. Основным антигеном вируса ящура является белок головки вируса VP1. Однако сам по себе этот белок, выделенный в очищенном состоянии из вирусных частиц, или полученный из клеток *E. coli*, используемых при клонировании гена *VP1*, обладает слабым антигенным действием и не может использоваться в качестве вакцины. Определение нуклеотидной последовательности клонируемого гена позволяет, зная генетический код (см. главу 12), легко определить полную последовательность аминокислот в белке VP1. После того как полная последовательность аминокислот известна, нетрудно химически синтезировать более короткие полипептиды, обладающие сильными антигенными свойствами и индуцирующими синтез антител против целых вирусных частиц.

Вследствие различия в механизмах экспрессии генов у прокариот и эукариот, *E. coli* может оказаться хозяином, мало подходящим для производства белков эукариотических организмов. Поэтому разработаны методы получения векторов для клонирования различных генов в клетках дрожжей – одноклеточных эукариот. Эти клонирующие векторы получают из репликонов дрожжевых клеток, так называемых 2μ-плазмид. Точки начала репликации этих векторов взяты у плазмид 2μ и у pBR322, в результате чего они могут реплицироваться как в дрожжевых клетках, так и в *E. coli.* Примером использования дрожжей для синтеза белков посредством клонирования генов эукариот может служить осуществленный таким образом синтез интерферона человека (интерферон – белок, обладающий противовирусным действием в клетках человека и, возможно, противоопухолевым действием вообще).

Дрожжевые клетки наиболее подходят, по-видимому, для производства не содержащих вирусы вакцин против болезни человека, вызываемой вирусом гепатита В. Этот вирус состоит из нуклеопротеинового кора, содержащего геном вируса и окруженного фосфолипидной мембраной, поверхность которой составляют кодируемые геномом вируса белки. Антигенно активной составляющей является белок поверхности вируса, однако для сильной антигенной активности необходимо, чтобы этот белок входил в состав фосфолипидной мембраны. Мембранная система дрожжевых клеток аналогична системе других эукариотических организмов и отлична от мембранной системы *E. coli.* Когда белок, кодируемый клонируемым геном вируса гепатита В, накапливается в дрожжевых клетках, то образуются фосфолипидные частицы с белковой поверхностью, которые способны индуцировать производство вакцинируемым организмом антител против вируса в целом. С другой стороны, при накоплении этого белка в клетках *E. coli* он не связывается с фосфолипидами и поэтому не вызывает сильной антигенной реакции.

Применение методов рекомбинантных ДНК к фундаментальным генетическим исследованиям мы рассмотрим в различных главах второй части.

Литература

Abelson J. (1977). Recombinant DNA: examples of present-day research, Science, **196,** 159–160.

Abelson J. (1980). A revolution in biology, Science, **209,** 1319–1321.

Arber W. (1979). Promotion and limitation of genetic exchange, Science, **205,** 361–365.

Berg P. (1981). Dissections and reconstructions of genes and chromosomes, Science, **213,** 296–303.

Bittle J. L. et al. (1982). Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence, Nature, **298,** 30–33.

Britten R., Kohne D. E. (1968). Repeated sequences in DNA, Science, **161,** 529–540.

Chang S., Cohen S. N. (1977). *In vivo* site-specific genetic recombination promoted by the *Eco RI* restriction endonuclease, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74,** 4811–4815.

Gilbert W. (1981). DNA sequencing and gene structure, Science, **214,** 1305–1312.

Greever R. F. et al. (1981). Direct identification of sickle cell anemia by blot hybridization, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78,** 5081–5085.

Itakura K. et al. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin, Science, **198,** 1056–1063.

Laird C. D., McCarthy B. J. (1969). Molecular characterization of the *Drosophila* genome, Genetics, **63,** 865–882.

Maniatis T. et al. (1978). The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA, Cell, **15,** 687–701.

Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. [Имеется перевод: *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* 1984. Молекулярное клонирование, М., Мир.]

Nathans D. (1979). Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics, Science, **206,** 903–909.

Roberts R. J. (1976).Restriction endonucleases, CRC Crit. Rev. Biochem., **4,** 123–164.

Rodriguez R. L., Tait R. C., 1983. Recombinant DNA Techniques: An Introduction, Addison-Wesley, Reading, Mass.

Sanger F. (1981). Determination of nucleotide sequences in DNA, Science, **214,** 1205–1210.

Smith H. O. (1979). Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases, Science, **205,** 455–462.

Valenzuela P. et al. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast, Nature, **298,** 347–350.

Wetmur J., Davidson N. (1968). Kinetics of renaturation of DNA, J. Mol. Biol., **31,** 349–370.

Ключевые слова и понятия

Библиотека генома
Вектор для клонирования ДНК
Зонд
Карта сайтов рестрикции
Кинетика ренатурации ДНК
Линкер
Метод Саузерна
Определение нуклеотидной последовательности
Палиндромная нуклеотидная последовательность
Прогулка по хромосоме
Рекомбинантная ДНК
Уравнение C_0t
Фермент модификации ДНК
Фермент рестрикции ДНК
Электрофорез в геле

Задачи

9.1. Препарат линейной вирусной ДНК обрабатывают указанными ниже ферментами и их комбинацией. Получившийся набор рестриктов подвергают электрофорезу. На основе представленных в таблице результатов постройте карту рестрикции вирусной ДНК.

Фермент	Размеры фрагмента (в т. п. н.) (1 т. п. н. = = 1000 п. н.)
Bgl II	5 и 10
Hga I	5 и 10
Sma I	2 и 13
Bgl II и *Hga* I	5
Bgl II и *Sma* I	2, 5 и 8
Hga I и *Sma* I	2, 3 и 10

9.2. Препарат кольцевой плазмидной ДНК подвергают действию указанных ферментов, а затем анализируют фрагменты при электрофорезе в геле. Используя представленную информацию, постройте карту рестрикции этой плазмидной ДНК.

Фермент	Размеры фрагментов (т. п. н.)
Xma I	20
Mbo I	10
Xma I и *Mbo* I	3, 7 и 10

9.3. Препарат линейной вирусной ДНК обрабатывают рестриктазой *Sma* I до полного расщепления. Электрофорез в геле выявляет присутствие фрагментов сле-

дующих размеров (т. п. н.): 10, 7, 6, 3 и 2. Параллельно интактную вирусную ДНК расщепляют той же эндонуклеазой неполностью. Полученные при неполном расщеплении пять фрагментов обозначены в порядке убывания размеров буквами от А до Е. Затем каждый из этих фрагментов обработан рестриктазой *Sma* I до полного расщепления и подвергнут электрофорезу. Полученные результаты представлены в таблице. Постройте карту рестрикции *Sma* I вирусной ДНК.

Фрагменты, полученные при неполной рестрикции	Размер фрагментов после полной рестрикции (в т. п. н.)
A	10; 6; 2
B	7; 6; 2
C	10; 3
D	7; 2
E	6; 2

9.4. Препарат кольцевой плазмидной ДНК длиной 18 т. п. н подвергают полной рестрикции эндонуклеазой *Kut* I. Электрофорез в геле выявляет наличие фрагментов следующих размеров: 5,0; 4,0; 3,5; 3,0; 1,5 и 1,0. Неполная рестрикция интактной плазмидной ДНК той же эндонуклеазой с последующим разделением фрагментов посредством электрофореза в геле показывает существование пяти фрагментов, обозначенных в порядке убывания размеров буквами от А до Е. Результаты последующей полной рестрикции этих фрагментов представлены в таблице. Постройте рестрикционную карту кольцевой плазмидной ДНК.

Фрагменты при неполной рестрикции	Размеры фрагментов после полной рестрикции
A	5,0; 3,0; 1,0
B	3,5; 3,0; 1,0
C	5,0; 1,5
D	3,5; 1,0
E	4,0; 3,0; 1,0

9.5. Фрагмент, полученный при расщеплении рестриктазой *Bgl* II ДНК *Cannabis sativa* клонируется в сайте *Bam* HI плазмиды pBR 322. При попытке выделить этот важный участок из плазмидной ДНК оказывается, что ни *Bam* HI, ни *Bgl* II не вырезают ДНК *C. sativa* из плазмидной. Почему? Какой фермент рестрикции следует использовать, чтобы выделить растительную ДНК из рекомбинантной плазмиды?

9.6. При конструировании векторов серии харон оказывается, что все фаговые частицы несут встроенные участки ДНК. Почему не обнаруживаются фаговые частицы, которые несут лишь левое и правое плечо молекулы ДНК вектора.

9.7. Линейный фрагмент ДНК *Eco* RI длиной 2,5 т. п. н. с единственным сайтом рестрикции *Hha* I клонируется в сайте Eco RI плазмиды длиной 5 т. п. н. Карты рестрикции этих двух молекул ДНК изображены на рис. 9.20. Участки линейной ДНК могут быть клонированы в двух ориентациях.

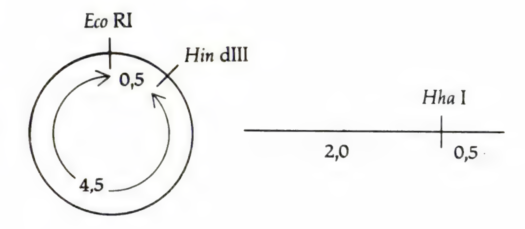


Рис. 9.20. Карты сайтов рестрикции молекул ДНК из условия задачи 9.7.

1) Каковы два способа ориентации?

2) Совместная обработка рестриктазами *Hin* dIII и *Hha* I дает фрагменты длиной 1 и 6,5 т. п. н. Какова ориентация клонируемого фрагмента?

9.8. Фрагмент ДНК длиной в 10 пар нуклеотидов был помечен с 3′-конца и последовательность нуклеотидов определялась способом, схематически изображенным на рис. 9.8. Результаты предста-

влены в таблице. Какова нуклеотидная последовательность фрагмента?

C	T	A	G
	—		
			—
—			—
—			
	—		
		—	
		—	
			—
		—	

9.9. Расщепление ДНК фага λ рестриктазой *Hin*dIII дает семь фрагментов (рис. 9.7). Продумайте постановку простого эксперимента с использованием полинуклеотидкиназы, позволяющего определить, какие из двух фрагментов содержат концевые точки ДНК λ.

9.10. Дано два препарата интактной ДНК фага λ: один дикого типа и второй λ *dgal*. Фаг λ *dgal* комплементирует мутанты по гену *K*, но не комплементирует мутанты по гену *J* (см. рис. 7.7). Сравните картину распределения *Hin*dIII – рестриктов, которую вы ожидаете получить при расщеплении ДНК λ *dgal*, с соответствующей картиной для ДНК фага дикого типа, представленной на рис. 9.7. Полный ответ требует решения задачи 9.9.

9.11. Используемые при клонировании фаги λ могут включать до 20 т. п. н. интегрированной чужеродной ДНК. С другой стороны, космиды (гибрид фага λ с плазмидой) могут включать и переносить до 54 т. п. н. чужеродной ДНК. Что бы вы выбрали при создании библиотеки ДНК человека и почему? Геном человека содержит около $3 \cdot 10^9$ нуклеотидных пар.

9.12. На рис. 9.21 изображен график кинетики ренатурации фрагментированной ДНК троглодита. Что вы можете сказать о его геноме, основываясь на следующих данных: 1) геном *E. coli* содержит $3{,}2 \cdot 10^6$ пар нуклеотидов и имеет мол. массу $2{,}5 \cdot 10^9$ Да; 2) график кинетики ренатурации ДНК *E. coli*, производившейся в тех же условиях, что и представленный на рис. 9.21, характеризуется значением $c_0 t_{1/2} = 5$; 3) содержание ДНК в сперме троглодита составляет $37{,}5 \cdot 10^9$ Да.

9.13. Серьезные разногласия вызывает вопрос о том, являются ли хромосомы эукариот унинемными или полинемными, т. е. содержат ли они одну или несколько идентичных ДНК. Как может способствовать решению этого вопроса исследование кинетики ренатурации?

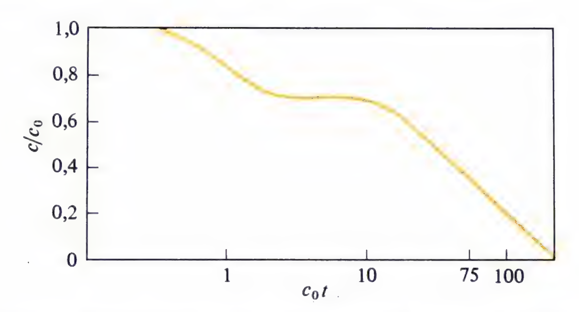


Рис. 9.21. Кинетика ренатурации фрагментированной ДНК троглодита из условия задачи 9.12.

Оглавление

Предисловие редактора перевода 5

Предисловие 7

1 Введение 13

Вирусы 14
Прокариоты: бактерии и сине-зеленые водоросли 17
Одноклеточные и многоклеточные эукариоты 18
Митоз 22
Мейоз 26
Значение мейоза 33

2 Менделевская генетика 37

Первые представления о наследственности 37
Открытие законов наследственности 38
Методы Менделя 39
Доминантность и рецессивность 40
Расщепление 42
Гены – носители наследственности 46
Независимое комбинирование 48
Тригибридные скрещивания 50
Множественные аллели 53
Генотип и фенотип 56

3 Хромосомные основы наследственности 64

Гены и хромосомы 64
Наследование, сцепленное с полом 67
Нерасхождение X-хромосом 70
Вторичное нерасхождение 72
Сцепленное с полом наследование у человека и других видов 75
Y-хромосома 80
Определение пола 80
Отношение полов 84

4 Природа генетического материала 88

Бактерии как экспериментальный объект 89
Экспериментальные исследования бактериофагов 91
ДНК – трансформирующий фактор пневмококка 93
Нуклеиновые кислоты – наследственный материал вирусов 96
Химический состав и строение нуклеиновых кислот 100
Модель структуры ДНК Уотсона – Крика 104
Проверка модели Уотсона – Крика 108
Различные формы организации двухцепочечной ДНК 113

Организация ДНК в хромосомах 116
Общие особенности репликации ДНК 120

5 Геном эукариот 127

Рекомбинация сцепленных генов 129
Генетические карты 134
Трехфакторные скрещивания 135
Генетическая интерференция 137
Когда происходит кроссинговер? 139
Мейоз у грибов 140
Цитологические наблюдения кроссинговера 144
Корреляция между генетическими и цитологическими картами хромосом дрозофилы 145
Внеядерная наследственность 150

6 Тонкая структура гена 159

Бактериофаг как генетическая система 160
Система *rII* бактериофага T4 161
Природа мутаций в области *rII* 163
Функциональные особенности *rII*-мутаций 166
Цистрон 168
Картирование *rII*-мутаций с помощью делеций 170
Предельная разрешающая способность рекомбинационного анализа 175
Уточнение генетической терминологии 175
Комплементационный анализ у высших эукариот 176
Рекомбинационный анализ тонкой структуры гена у высших эукариот: дрозофила 179

7 Геном вируса 190

Размножение бактериофагов 191
Мутантные бактериофаги 193
Комплементационный анализ условно летальных мутаций фага φX174 195
Рекомбинационный анализ мутантов фага φX174 197
Умеренный бактериофаг λ 204
Гены фага λ 205
Профаг λ 208
Сопоставление генетической и физической карт фага λ 211
Организация генома фагов T2 и T4 213

8 Бактериальный геном 227

Мутанты *E. coli* 228
Генетические элементы *E. coli* 230
F-фактор: генетический элемент, определяющий пол бактерий 231
Физическое картирование бактериальных генов методом прерванной конъюгации 236
Кольцевая форма генома *E. coli* 238
F′-штаммы и частичные диплоиды 239
Подвижные генетические элементы (транспозоны) 241
Генетическое картирование *E. coli* 246
Конъюгационное картирование 247
Трансдукционное картирование 249
Обзор результатов генетического анализа 255

9 Методы работы с ДНК 260

Кинетика ренатурации ДНК 261
Рестрикция ДНК и ферменты модификации 266
Рестрикционный анализ молекул ДНК 270
Определение последовательности нуклеотидов в ДНК (секвенирование) 273
Метод рекомбинантных ДНК 275
Векторы для клонирования ДНК 277
Библиотеки геномов 281
Обзор методов работы с ДНК 288

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

Франциско Айала, Джон Кайгер

СОВРЕМЕННАЯ ГЕНЕТИКА

В ТРЕХ ТОМАХ

Том 1

Научный редактор М. Р. Погосбекова
Мл. редактор О. В. Шагинян
Художник Л. М. Муратова
Художественный редактор А. Я. Мусин
Технический редактор М. А. Страшнова
Корректор Н. В. Андреева

ИБ № 6143

Сдано в набор 24.10.86. Подписано к печати 21.09.87. Формат $70 \times 100^1/_{16}$. Бумага офсетная № 1. Печать офсетная. Гарнитура таймс. Объем 9,25 бум. л. Усл. печ. л. 24,05. Усл. кр.-от. 48,43. Уч. изд. л. 25,16. Изд. № 4/4951. Тираж 15000 экз. Зак. 1215. Цена 2 р. 20 к.

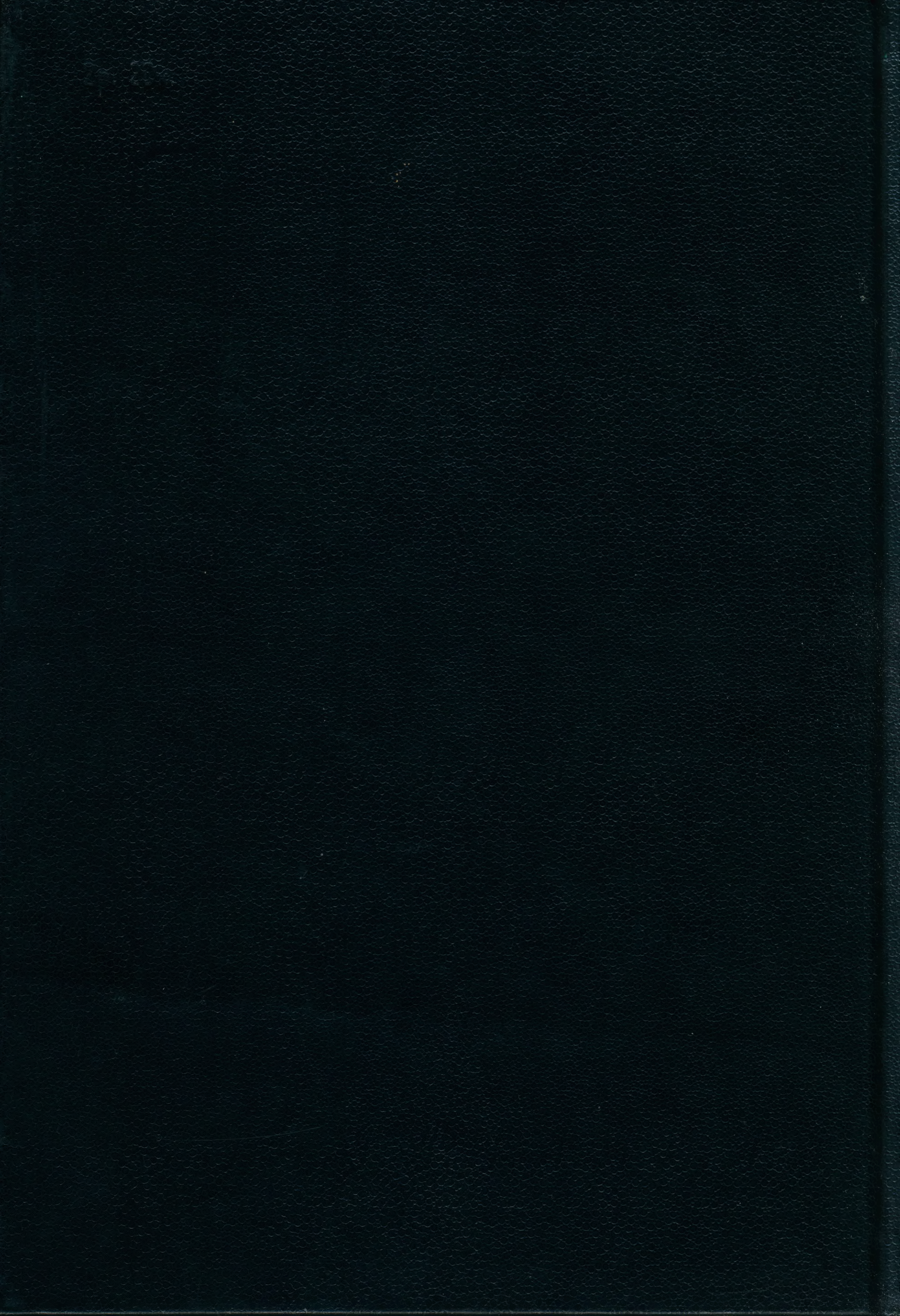
ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома
при Государственном комитете СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли
г. Можайск, ул. Мира, 93.









СОВРЕМЕННАЯ ГЕНЕТИКА 1